

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique**

**Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou**

**Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques**

**Département de biologie animale et biologie végétale**



## **Mémoire**

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologiques.

**Option : Génétique et amélioration des plantes**

**Intitulé :**

**Etude du niveau d'agressivité de 25 souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* agent de la fusariose vasculaire (Bayoud) du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.).**

**Soutenu publiquement le : 03 / 11 / 2015**

**Présenté par : M<sup>elle</sup> BENLAHCEN Nesrine**

**Devant le jury :**

**Présidente : M<sup>me</sup> K. TALEB-TOUDERT**

**Maitre assistante (B) à l'UMMTO.**

**Promotrice : M<sup>elle</sup> F.BESSEDIK**

**Chargée de recherche à l'INRAA.**

**Co Promotrice : M<sup>me</sup> S. YAKOUB-BOUGDAL**

**Professeur à l'UMMTO.**

**Examinatrice : M<sup>me</sup> L. LAKABI**

**Maitre assistante (A) à l'UMMTO.**

**Examinatrice : M<sup>me</sup> H. BOUAZIZ-YAHIA TENE**

**Maitre assistante (A) à l'UMMTO.**

**Invitée : M<sup>me</sup> D. YATTA**

**Chargée de recherche à l'INRAA.**

**2014/2015**

## **Remerciements**

*Cette expérience a été menée grâce à de nombreuses personnes que nous avons rencontrées durant la réalisation de ce travail et que nous souhaitons remercier.*

*Ce travail a été effectué dans le cadre d'un projet de recherche lancé par la division Biotechnologie et Amélioration des Plantes de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA).*

*Tout d'abord, je remercie le Dieu, notre créateur de m'avoir donné la force, la volonté et le courage afin d'accomplir ce travail modeste.*

*Je tiens à exprimer toute ma profonde reconnaissance et gratitude à ma promotrice Madame **F. BESSEDIK**, chargée de recherche à l'INRAA, qui a bien voulu, par son aimable bienveillance, diriger ce travail, je la remercie de m'avoir encadrée, orientée, aidée et conseillée, son encadrement était exemplaire.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Madame **S. YAKOUB BOUGDAL** professeur au département de biologie végétale qui a bien voulu suivre ce travail, en tant que responsable du Master. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance pour m'avoir fait partager vos connaissances et votre savoir.*

*Je remercie également très chaleureusement, mon enseignante Madame **K. TALEB** (M.A.A) à l'UMM de Tizi-Ouzou, qui m'a soutenu tout au long de mon cursus académique. Une femme très douce qui était comme une mère pour moi.*

*Je remercie vivement Madame **D. YATTA**, pour son support moral qu'elle m'a apporté tout au long de ma démarche et l'honneur qu'elle a fait d'assister à ma soutenance malgré ses occupations et ses obligations.*

*Je suis très reconnaissante à Madame **L.LAKABI** et Madame **H. BOUAZIZ** (M.A.A) à l'UMM de Tizi-Ouzou, mes remerciements les plus vifs. Je suis convaincue que leurs judicieuses remarques me seront d'une grande utilité.*

*J'adresse par la même occasion mes remerciements à Madame **L.KADRI** pour sa gentillesse, son aide, sa sympathie, nous avons passé un séjour inoubliable au sein de ce laboratoire.*

*Enfin, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma famille qui m'a toujours soutenue et à tous ceux qui ont participé à réaliser ce mémoire. Ainsi que l'ensemble des enseignants qui ont contribué à ma formation.*

*Merci à tous mes amis, qui me rendent tous les jours la vie belle par leur présence.*

## **Dédicaces**

*A mes chers parents qui m'ont beaucoup aidé pour accomplir mon travail, et qui ont veillé pour que je mène à bien mes études, tout ce que je dis n'est qu'une petite goutte dans l'océan par rapport à leur amour et leur bienveillance. J'espère avoir réalisé une partie de leurs rêves.*

*A mon petit frère «**Manou**» qui a toujours été présent pour moi, et a risqué sa vie pour moi. Je ne te remercierai jamais assez.*

*A ma sœur «**Ryma**» qui m'a prodigué de bons conseils et m'a soutenue.*

*Je dédis mon travail également à «**Savio**», tadj raci, qui m'a soutenue par tous les moyens, qui m'a aidé et protégé tout au long de cette démarche, il a cru en moi et était présent à chaque moment. J'ai trouvé en toi le soutien et le confort.*

*A mes amis **Karima, Radia** et sa sœur **Sissa**, votre sourire et votre bonne humeur m'ont rendu la vie plus belle. Je n'oublierais jamais les moments qu'on a passés ensemble merci pour tout.*

*Je dédie aussi ce modeste travail à mon oncle Mustapha da3chouch de la famille, à mon oncle bien aimé krim, sa femme Samira, Tata Mina une tante irremplaçable présente à tout moment de notre vie, et surtout à ma Grand mère que dieu la protège.*

*Je souhaite à ma petite sœur le même parcours que moi si ce n'est plus.*

# **TABLE DES MATIERS**

# TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux

Liste des figures

Abréviations

INTRODUCTION.....1

## 1<sup>ère</sup> Partie: Données bibliographique

### Chapitre I: Généralités sur le Palmier dattier

1. Origine.....	3
2. Répartition géographique.....	4
2.1. Répartition géographique dans le monde.....	4
2.2. Répartition géographique en Algérie.....	4
3. Importance économique du palmier dattier.....	4
4. Taxonomie.....	5
5. Genre <i>Phoenix</i> .....	6
6. Diversité variétale.....	8
7. Les maladies du palmier dattier.....	9
7.1. Les maladies fongiques.....	9
7.1.1. La pourriture de l'inflorescence ou Khamedj.....	11
7.1.2. La pourriture du Cœur (palmier fou).....	11
7.1.3. La pourriture du bourgeon ou belâat.....	11
7.1.4. Le Bayoud.....	12

## Chapitre II: Fusariose du palmier dattier (Bayoud)

1. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	13
2. La forme spéciale <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp . <i>albedinis</i> .....	14
3. Position systématique.....	15
4. Caractères physiologiques du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp . <i>albedinis</i> .....	15
5. Caractères morphologiques du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp . <i>albedinis</i> .....	15
5.1. Caractères macroscopiques.....	15
5.2. Caractères microscopiques.....	16
6. Cycle de vie.....	17
7. Historique et progression du bayoud.....	19
7.1. Symptômes de la maladie.....	20
7.1.1. Symptômes externes.....	20
7.1.2. Symptômes internes.....	21
7.2. Moyens de lutte.....	21
7.2.1. Mesures Prophylactiques (Législation et Police Phytosanitaire) .....	22
7.2.2. Eradication Des Foyers de Bayoud.....	22
7.2.3. Lutte Culturelle.....	22
7.2.4. Lutte chimique.....	22
7.2.5. Lutte Génétique.....	23
7.2.6. Lutte Biologique.....	23
7.2.7. Lutte physique.....	23
7.2.8. Lutte préventive.....	24

## 2<sup>ème</sup> Partie: Etude expérimentale

### Chapitre III: Matériels et Méthodes

1. Cadre et de l'étude.....	25
2. Déroulement de l'étude.....	25
3. Période et type d'étude.....	25
4. Matériel biologique.....	25
4.1. Matériel fongique.....	25
4.2. Matériel végétal.....	26
5. Milieux de culture.....	27
5.1. Milieu PDA solide.....	27
5.2. Milieu de Pikovskaya (1948) .....	27
6. Méthodologie.....	28
6.1. Lancement des cultures.....	28
6.1.1. Isolement et purification des souches.....	28
6.1.2. Purification.....	29
7. La culture monospore.....	29
7.1. Identification.....	29
7.1.1. Etude macroscopique.....	30
7.1.2. Etude microscopique .....	30
8. Comptage des spores sur cellule de Malassez.....	30
8.1. Préparation de l'inoculum.....	31
9. Inoculation des feuilles détachées par <i>Foa</i> .....	31
10. Solubilisation du phosphate .....	32
11. Extraction d'ADN génomique.....	33

11.1. Préparation du matériel vivant.....	33
11.2. Extraction de l'ADN.....	34
11.3. Précipitation d'ADN.....	35
11.4. Purification d'ADN.....	35
12. Quantification d'ADN.....	36
12.1. Qualité d'extraction sur gel d'agarose.....	36
12.2. Quantification par spectrophotométrie « Biophotomètre » .....	37
13. La réaction de polymérisation en chaîne PCR/ISSR.....	37
13.1. Analyse des produits de PCR.....	39

## Chapitre IV: Résultats et Discussion

1. Résultats.....	40
1.1. Isolement du <i>Foa</i> .....	40
1.2. Caractérisation des isolats.....	40
1.2.1. Identification macroscopique .....	41
1.2.2. Identification microscopique.....	41
1.3. Test du pouvoir pathogène par l'inoculation des feuilles.....	41
1.4. Solubilisation du phosphate.....	43
1.5. Extraction de l'ADN génomique.....	45
1.5.1. Contrôle et confirmation de la qualité sur gel d'agarose.....	45
1.5.2. Qualité et quantification de l'ADN par spectrophotométrie (biophotomètre) .....	46
1.7. La réaction de la PCR/ISSR.....	47
2. Discussion .....	48

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....51**

**Références bibliographiques**

**Annexes**

**Résumé**

**Abstract**

# **LISTE DES TABLEAUX**

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Production mondiale des dattes selon (F.A.O, 2012).....	5
<b>Tableau 2</b> : Les quatorze espèces du genre ' <i>Phoenix</i> ', ainsi que leurs répartitions, (Chevalier, 1952).....	7
<b>Tableau 3</b> : Principaux ravageurs et maladie menaçant certains pays de l' Afrique du Nord.....	10
<b>Tableau 4</b> : Quelques exemples des souches de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp et leurs plantes hôtes. (Armstrong et Armstrong, 1981; Mac hardy et beckman 1981; Lamprecht et <i>al.</i> , 1986; Summerell et <i>al.</i> , 2001; Alves -Santos et <i>al.</i> , 2007) (Inhaminio, 2010).....	14
<b>Tableau 5</b> : Codes des souches <i>Foa</i> et le lieu de leur isolement.....	26
<b>Tableau 6</b> : Séquence ISSR utilisées.....	37
<b>Tableau 7</b> : Composition du mélange réactionnel de la PCR/ISSR.....	38
<b>Tableau 8</b> : Programme PCR.....	38
<b>Tableau 9</b> : Observation des feuilles détachées après 50 jours.....	42
<b>Tableau 10</b> : Indice de solubilisation du phosphate.....	45
<b>Tableau 11</b> : Quantification d' ADN du rapport 260/280 nm au spectrophotomètre .....	47

# **LISTE DES FIGURES**

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Propagation de la culture du palmier dattier dans l'ancien continent (D'après Munier, 1973).....	3
<b>Figure 2</b> : Représentation de la distribution des différentes espèces de <i>Phœnix</i> dans le monde (D'après Barrow, 1998 ; Henderson, 2009).....	6
<b>Figure 3</b> : <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> ( <i>Foa</i> ), en milieu PDA (a et b).....	16
<b>Figure 4</b> : Aspect microscopique du <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> (Djerbi, 1983).....	17
<b>Figure 5</b> : Cycle infectieux du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> , agent causal de la maladie du Bayoud (modification apportée depuis Agrios, 2005; Sedra, 2006).....	18
<b>Figure 6</b> : Distribution du bayoud en Afrique du nord (Tirichine, 2002).....	19
<b>Figure 7</b> : Symptômes externes du bayoud (Bessedik, 2006).....	20
<b>Figure 8</b> : Symptômes unilatéraux sur une palme (Bessedik, 2006).....	21
<b>Figure 9</b> : Symptômes internes du bayoud (flétrissement latérale) (Bessedik, 2006).....	21
<b>Figure 10</b> : Milieu de culture Pikovskaya sur agitateur thermique.....	27
<b>Figure 11</b> : Les étapes d'isolement de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> à partir des rachis..	28
<b>Figure 12</b> : Schéma du quadrillage de la cellule Malassez.....	30
<b>Figure 13</b> : Préparation de la suspension sporale de chaque isolat pour le comptage sur cellule Malassez.....	31
<b>Figure 14</b> : Préparation des feuilles détachées pour l'inoculation avec les ajustements de la solution sporale des souches (a,b et c ).....	32
<b>Figure 15</b> : inoculation du milieu PVK par <i>Foa</i> .....	33
<b>Figure 16</b> : Obtention du matériel fongique pour l'extraction d'ADN (a et b).....	34
<b>Figure 17</b> : Extraction d'ADN avec le CTAB et NaCl.....	34
<b>Figure 18</b> : Broyage du matériel fongique avec le tampon de lyse au CTAB.....	35
<b>Figure 19</b> : Récupération de l'ADN par le Chloroforme-isoamyle.....	35
<b>Figure 20</b> : Centrifugation du surnageant à 10000 rpm à 4°C.....	36
<b>Figure 21</b> : Migration d'ADN sur gel d'agarose sous une tension de 110 volts.....	36
<b>Figure 22</b> : Quantification par spectrophotométrie.....	37
<b>Figure 23</b> : Mélange réactionnel de la PCR/ISSR dans la plaque 96 puits.....	39
<b>Figure 24</b> : Isolement du champignon à partir des rachis infectés.....	40

<b>Figure 25</b> : Variabilité des aspects morphologiques observée chez nos isolats <i>Foa</i> sur milieu PDA.....	41
<b>Figure 26</b> : Observation microscopique de <i>Foa</i> avec un grossissement X40.....	41
<b>Figure 27</b> : Flétrissement de la feuille détachée (a et b).....	43
<b>Figure 28</b> : Halos de transparence autour des souches de <i>Foa</i> (Solubilisation du phosphate par <i>Foa</i> ).....	44
<b>Figure 29</b> : Visualisation du gel sur la lampe UV Trans-illuminateur.....	46

# **ABREVIATIONS**

## Abréviations

<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique.
<b>BET :</b>	Bromide d'Ethidium.
<b>CTAB:</b>	Cetyl-Trymethyl Ammonium Bromide
<b>DN:</b>	Deglet Nour.
<b>EDTA:</b>	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
<b>Foa:</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>
<b>ISSR:</b>	Inter-simple sequence repeat
<b>INRAA:</b>	Institut National de Recherche Agronomique d'Algérie
<b>M:</b>	Molarité
<b>Mn:</b>	Minute.
<b>Nm :</b>	Nanomètre
<b>Ng:</b>	Nanogramme
<b>PCR:</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PDA:</b>	Potato Dextrose Agar
<b>pH:</b>	Potentiel d'hydrogène.
<b>Rpm:</b>	Rotation par minute.
<b>SM:</b>	Solution Mère
<b>TBE:</b>	Tris-Hcl, Boric acid, EDTA
<b>TG:</b>	Tagaza.
<b>TKB:</b>	Takarboucht.
<b>UV:</b>	Ultra-violet

# **INTRODUCTION**

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) fait partie des premières espèces fruitières cultivées dont la culture existe depuis la plus haute antiquité (Munier, 1973; Denis, 2013), arbre cultivé particulièrement dans les zones arides ou désertiques de l'Afrique du Nord et du Moyen Orient.

La culture du palmier dattier est sujette à divers problèmes phytosanitaires qui entravent son développement et son extension. Le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) causé par un champignon d'origine tellurique *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Killian et Maire, 1930), est la maladie la plus destructive et la plus menaçante dans l'Afrique du Nord. Elle est répandue surtout au Maroc et la plus grande partie des palmeraies du Sud Ouest de l'Algérie (Péreau-Leroy, 1958; Djebri 1982; Brac et Benkhalifa, 1991).

Ce champignon est l'agent d'un flétrissement vasculaire, la maladie est généralement fatale et l'arbre meurt au bout de 6 mois à 2 ans. Les principaux moyens de transmission sont les rejets destinés à la plantation, les spores, l'irrigation, les ustensiles de jardinage et les articles artisanaux réalisés avec les produits du palmier.

De prime abord il conviendrait de préciser que pour étudier cette infection tout particulièrement l'agent causal de la fusariose vasculaire du palmier dattier, nous devons mettre en exergue le comportement du pathogène en présence de l'hôte, ainsi que sa caractérisation.

Dans ce contexte notre travail s'inscrit dans le cadre du programme de recherche de la division de biotechnologie et d'amélioration des plantes de l'INRAA et qui a pour objectif la lutte contre la fusariose par la voie de la biotechnologie.

A cet effet nous nous proposons de caractériser et d'étudier le degré d'agressivité de 25 souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* agent de la fusariose du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.).

Nous avons adopté le plan suivant en abordant :

- En premier lieu, réisolement et purification des isolats,
- Observation macro et microscopique des isolats,

- Evaluation du degré de l'agressivité des isolats par l'inoculation des feuilles détachées du palmier dattier, pour cela nous avons utilisé des feuilles saines de 3 cultivars (Takarboucht, Deglet Nour et Tagaza), le premier résistant et les deux autres sensibles,
- Solubilisation des phosphates.
- Enfin, nous nous proposons d'évaluer la diversité génétique entre les 25 isolats testés pour leur agressivité, par l'utilisation de marqueurs ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Pour cela deux amorces ISSR  $(ACC)_6CC$  et  $CCA(TGA)_5TG$  selon Baysal et al (2010) sont utilisées.

# **1<sup>ere</sup> PARTIE :**

## **Donnée Bibliographique**

**Chapitre I :**

**Généralités**

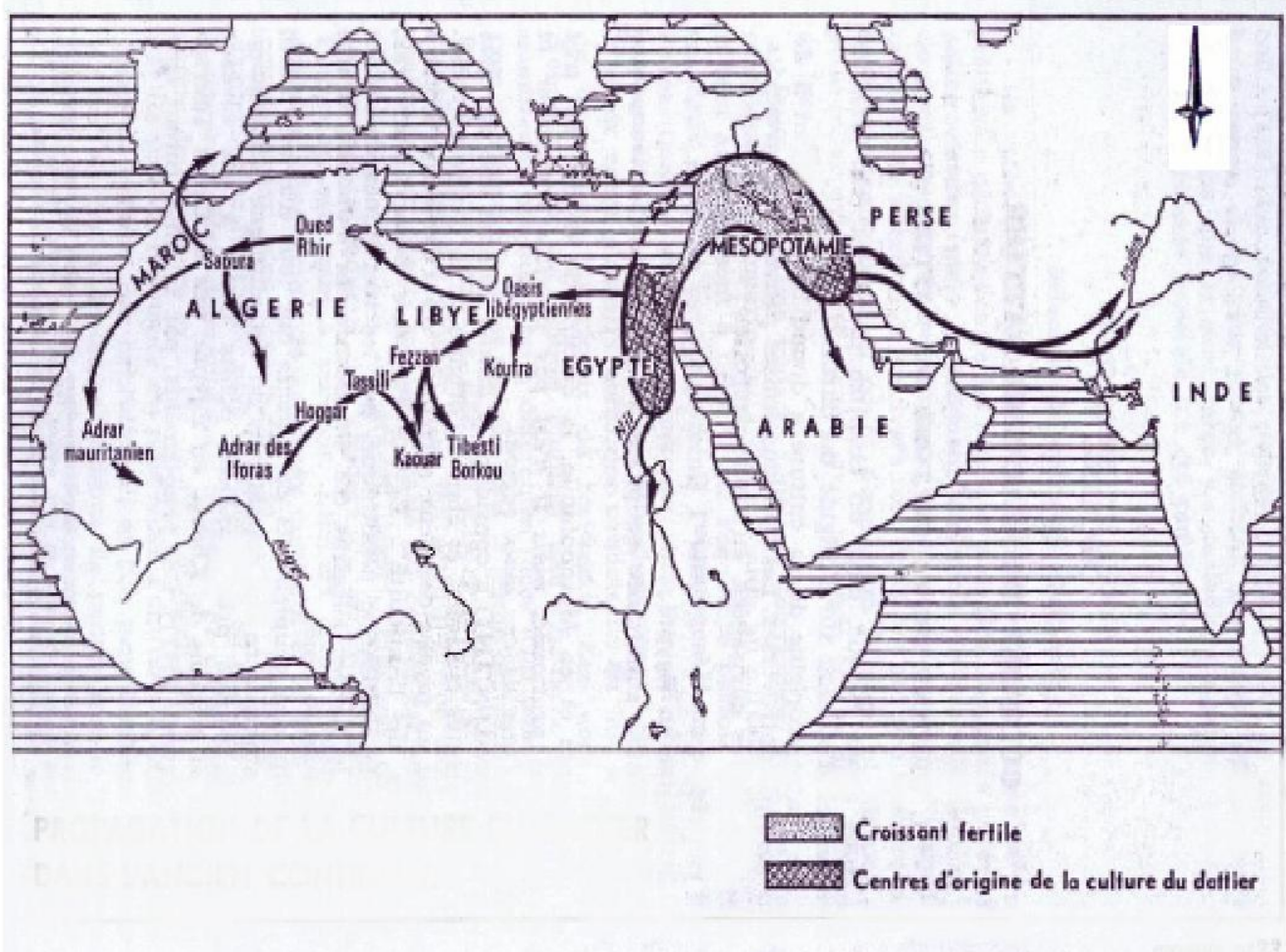
**sur le**

**Palmier dattier**

### 1. Origine

Les palmiers les plus anciens remontent au miocène. Le palmier dattier a été cultivé dans les zones arides et semi-arides de l'ancien monde situé entre l'Euphrate et le Nil vers 4500 ans avant J.-C. De là, sa culture fut introduite en Basse Mésopotamie vers l'an 2500 ans avant J.C. Depuis, elle progressa vers le Nord du pays et gagna la région côtière du plateau Iranien puis la vallée de l'Indus.

Depuis l'Egypte, les techniques culturales du dattier gagnèrent la Libye puis se propagèrent d'abord vers les autres pays du Maghreb comme la Tunisie, l'Algérie et le Sud Marocain et arrivèrent ensuite dans l'Adrar Mauritanien (Munier, 1973).



**Figure 1:** Propagation de la culture du palmier dattier dans l'ancien continent (D'après Munier, 1973).

### 2. Répartition géographique

#### 2.1. Répartition géographique dans le monde

L'aire de répartition du palmier dattier dans le monde, couvre les cinq continents. La culture du palmier dattier s'étend depuis le sud de l'Iran à l'Est jusqu'à la côte Atlantique de l'Afrique du Nord à l'Ouest.

Cette culture est concentrée dans les régions arides et semi arides du continent Africain, où le palmier dattier forme la végétation caractérisant les oasis. Les limites extrêmes de la distribution géographique sont entre l'altitude 10° Nord (Somalie) et 39° Nord (Elche en Espagne ou Turkménistan). Les secteurs les plus favorables pour cette culture sont situés entre 24° et 34° Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Egypte, Irak, Arabie Saoudite, Soudan,...) (Ben Abdellah, 1990; Zaïd, 2002).

Le palmier dattier se trouve aussi aux Etats-Unis entre 33° et 35° Nord, d'autres surfaces négligeables pour la culture du Palmier dattier sont à l'hémisphère sud (Australie, Mexique, Argentine)

#### 2.2. Répartition géographique en Algérie

Le palmier dattier est cultivé dans plusieurs oasis du sud Algérien, caractérisé par un climat chaud et sec.

La phoéniculture par son adaptation sur le plan agronomique, occupe une grande place dans l'agriculture oasienne. La zone de culture s'étend de la frontière marocaine à l'Ouest jusqu' à la frontière Tuniso-libyenne à l'Est. Du Nord au Sud du pays, elle s'étend depuis la limite Sud de l'Atlas saharien jusqu' à Reggane à l'ouest, Tamanrasset au centre et Djanet à l'Est. Les principales régions productrices de dattes sont concentrées à l'Est au niveau des Zibans, Oued Right, Oued Souf et la cuvette de Ouargla et le M'Zab. Sa densité diminue en se dirigeant vers l'Ouest où les principales oasis sont localisés dans la région de la Saoura, le Touat, le Gourara, le Tidikelt et El Goléa (Bougueddoura, 1991; Khelafi, 2013).

### 3. Importance économique du palmier dattier

La production mondiale des dattes est estimée à 7.025.222 tonnes pour l'année 2012, dont 39%soit 2.732.754 tonnes, proviennent du bassin méditerranéen (Tableau 1). L'Egypte est le 1<sup>er</sup> pays producteur avec 21% et l'Algérie classée au 4<sup>ème</sup> rang mondial avec 11 %, devancée par l'Iran 15% et l'Arabie Saoudite 14 % (F.A.O, 2012).

## Chapitre I:Généralités sur le Palmier dattier

Aujourd'hui, le potentiel phoénicicole Algérien est évalué à plus de 18 millions de palmiers dattiers sur une superficie de plus de 150 000 ha, soit une production annuelle dépassant les 7 millions de quintaux. Les produits dérivés du palmier contribuent également au développement de l'économie (aliment de bétail, brise vent, construction, confection d'objets artisanaux...etc). BUL d'info N° 34, 2014.

**Tableau 1:**Production mondiale des dattes selon (F.A.O, 2012).

<b>PAYS</b>	<b>PRODUCTION (TONNE)</b>
Egypte	1470000
Iran	1066000
Arabie Saoudite	1050000
<b>Algérie</b>	<b>789357</b>
Irak	650000
Pakistan	600000
Oman	270000
Emirat Arabie Unies	250000
Tunisie	190000
Libye	170000
Chine	150000
Maroc	113397
Autres pays	256468
<b>Total</b>	<b>7025222</b>

#### 4. Taxonomie

Le palmier dattier a été dénommé *Phœnix dactylifera*L. par Linné en 1734. *Phœnix* dérive de Phœnix, nom du dattier chez les Grecs de l'antiquité, qui le considéraient comme l'arbre des phéniciens ; *dactylifera* vient du latin *dactylus* dérivant du grec "dactylos" signifiant doigt, en raison de la forme du fruit (Munier, 1973).

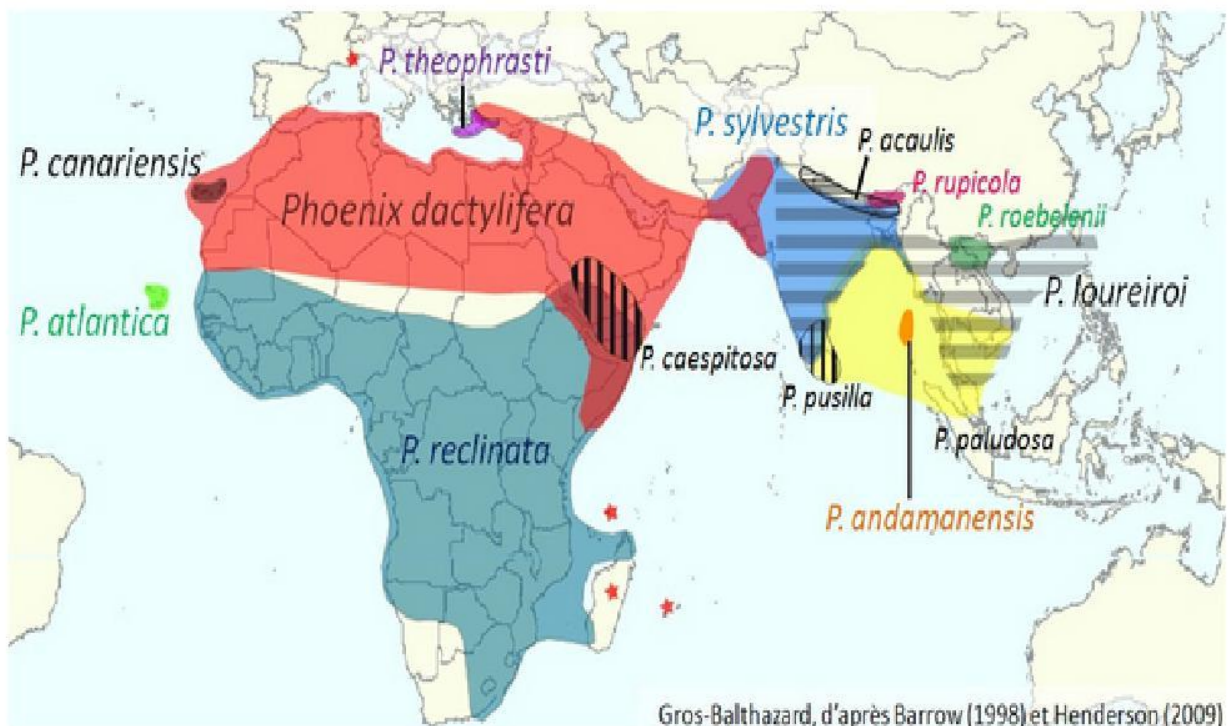
## Chapitre I: Généralités sur le Palmier dattier

- La classification botanique du palmier dattier d'après Munier (1973)

Embranchement	.....	Phanérogames.
Sous-embranchement	.....	Angiospermes.
Classe	.....	Monocotylédons
Groupe	.....	Phoenocoides.
Famille	.....	Arecaceae.
Sous famille	.....	Coryphoideae.
Genre	.....	<i>Phœnix</i> .
Espèce	.....	<i>Phœnix dactylifera</i> L.

### 5. Genre *Phoenix*

Le palmier du genre *Phoenix* comprend plusieurs espèces réparties dans les régions tropicales et subtropicales de l'ancien monde (Barrow, 1998 ; Govaert et Dranfield, 2005; Henderson, 2009).



**Figure 2:** Représentation de la distribution des différentes espèces de *Phœnix* dans le monde (D'après Barrow, 1998 ; Henderson, 2009).

## Chapitre I: Généralités sur le Palmier dattier

Le genre *Phoenix* renferme quatorze espèces (Tableau 2). Les espèces sont proches morphologiquement, parfois difficiles à distinguer (Pintaudet *et al.*, 2010). Par exemple, il existe peu de caractères permettant de différencier *P. dactylifera* de *P. theophrasti* (Barrow, 1998) et de *P. atlantica* (Henderson *et al.*, 2006).

**Tableau 2 :** Les quatorze espèces du genre '*Phoenix*', ainsi que leurs répartitions, (Chevalier, 1952).

L'espèce	Le nom commun	Distribution
<i>Poenixacaulis</i> Roxb (1820)	Palmier nain	Bengladesh et Inde
<i>Phoenix andamanensis</i> Barrow (1998)		Les Iles Andaman (Bengale)
<i>Phoenix atlantica</i> Chev (1935)	Palmier dattier des îles Cap-Vert ou Tamereira	Afrique occidentale et Iles Canaries
<i>Phoenix canariensis</i> Chabaud (1882)	Palmier des îles Canaries	Iles Canaries et Cap-Vert
<i>Phoenix caespitosa</i> Chiov (1929)		Péninsule arabe et le désert somalien
<i>Phoenix dactylifera</i> L. (1753)	Palmier dattier	Pays méditerranéens, l'Afrique et une partie de l'Asie. « introduit en Amérique du Nord et en Australie »
<i>Phoenix loureiroi</i> Kunth (1841)	Palmier dattier des montagnes	S'étend de l'Indonésie à l'Asie du Sud
<i>Phoenix paludosa</i> Roxb., Ind (1832)	Palmier juliana	Bengladesh, Tenasserim, Andaman, Iles Nicobar et Thailand
<i>Phoenix pusilla</i> Gaertn (1788)	Palmier dattier du Sri- lanka	Sri-lanka et Sud de l'Inde
<i>Phoenix reclinata</i> Jacq (1801)	Palmier nain	Afrique tropical (Sénégal et Ouganda) Asie (Yémen)
<i>Phoenix roebelenii</i> O'Brien (1889)	Palmier dattier pygmée	Sud-ouest de la Chine au nord du Vietnam et Laos
<i>Phoenix rupicola</i> Anderson., Linn. Soc. (1869)	Palmier dattier rocheux	Inde
<i>Phoenix sylvestris</i> L. Roxb (1832)	Palmier dattier sauvage ou Palmier sucre	Inde et Pakistan
<i>Phœnix theophrasti</i> Greuter (1967)	Palmier dattier de Crète	Grèce du sud, chypre et Turquie

Il n'existe pas ou peu de barrières reproductives entre les espèces, leur intégrité ayant été maintenue par isolation géographique ou écologique. Le genre *Phoenix* forme donc un exemple d'espèces qui peuvent s'hybrider entre elles comme c'est souvent le cas chez les arbres fruitiers le cerisier (Tavaud et *al.*, 2004), amandier (Kester et *al.*, 1991).

En culture, la plupart des hybrides existent. Dans les zones de sympatris, il existe également des hybrides interspécifiques (Munier, 1973). Le dattier s'hybride en effet avec *P. sylvestris* en Inde et au Pakistan, avec *P. reclinata* au Sénégal (Munier, 1973) et avec *P. canariensis* dans les îles canaries (Gonzales-Pérez et *al.*, 2004). Cependant, ces zones de sympatrie ne sont peut être pas naturelles, mais plutôt anthropiques du fait de la diffusion du dattier en dehors de son aire de distribution originelle. Ainsi, on ne sait en fait que peu de choses sur l'hybridation interspécifique dans les zones de sympatrie naturelle (Gros-Balthazard, 2013).

Enfin, l'espèce *Phoenix dactylefera* L. est cultivée pour ses fruits alors que *Phoenix sylvestris* est cultivé pour sa sève transformée en sirop ou en sucre (Chowdhery et *al.*, 2008; Newton et *al.*, 2013). En revanche, les autres espèces (notamment *P. canariensis* et *P. roebelinii*) qui sont cultivées par l'industrie horticole sont exploitées pour l'alimentation humaine et animale et la construction (Barrow, 1998).

### 6. Diversité variétale

En Algérie le patrimoine génétique du palmier dattier est exceptionnel car plus de 940 cultivars ont été inventoriés dont les principaux sont Takerbucht, Feggous, à l'ouest et DegletNour à l'est (Ben Khalifa et *al.*, 1991). En Tunisie, on compte plus de 300 cultivars et 150 sont comptabilisées au Maroc.

L'inventaire des cultivars de palmier dattier des régions d'OuedRighet d'Oued Souf en Algérie, a montré que le nombre de cultivars est de 175 pour Oued Righ et de 56 pour oued Souf. Par ailleurs, l'importance de la diversité génétique varie suivant les types de plantations. Ainsi, les plantations traditionnelles renferment l'ensemble des cultivars inventoriés. En revanche, les plantations modernes renferment six cultivars: DegletNour ; Deglet Beida, MechDegla, Ghars, Tinicine et Tantboucht, qui présentent une importance économique réelle. (Acourene et *al.*, 2001).

Les caractères morphologiques du palmier adulte et des fruits sont les critères habituellement utilisés pour distinguer les variétés. Aujourd'hui, sur la base d'une proposition maghrébine, «

Bioversity International» a édité les descripteurs du palmier dattier, ce qui permettra de décrire les variétés selon un standard commun. Il est évidemment possible de facilement caractériser ces variétés par analyse génétique.

En plus des cultivars identifiés, il existe dans les oasis des palmiers à catégorie intermédiaire, des palmiers multipliés issus de semis, qui n'ont donc pas les mêmes caractéristiques qu'un arbre greffé ce qui augmente le nombre de cultivars à environ 1 300.

### **7. Les maladies du palmier dattier**

Au niveau mondial, les ennemis de la culture du palmier dattier sont nombreux et diversifiés. La protection sanitaire de cette ressource phylogénétique est une nécessité pour avoir une production saine et importante. Les maladies sont causées par des agents pathogènes, des ravageurs tels que les acariens, les insectes et les nématodes. En plus des oiseaux, des rongeurs et d'autres petits animaux (Tableau 3).

#### **7.1. Les maladies fongiques**

Parmi les différents travaux effectués sur les maladies fongiques du palmier dattier nous citons celles de Djebri (1994) et Bounaga (1985).

Cette série de travaux a conduit à une meilleure connaissance de ces maladies citons parmi d'autres : le Khamedj, le Medjnoun, le Kelaat, et enfin le Bayoud sur lequel se base notre étude (Tableau 3).

## Chapitre I:Généralités sur le Palmier dattier

**Tableau 3 :** Principaux ravageurs et maladie menaçant certains pays de l’Afrique du Nord

Ravageurs et maladies	Agent responsable	Pays menacés de l’Afrique du Nord
<b>Ravageurs</b>	<i>Rhynchophoresferrugineus</i>	Tous les pays de l’Afrique du Nord
Le charançon rouge	et autres espèces dangereuses	(présent dans certains pays du golf arabe, Egypte et Espagne)
La cochenille verte Date Green Soft (ScaleInsect)	<i>Astrolecaniumphenicis.</i>	Tous les pays de l’Afrique du Nord (présent au Soudan)
Le papillon ravageur du palmier	<i>Paysandisiaarchon</i>	Tous les pays de l’Afrique du Nord (présent en France et en Espagne)
<b>Maladies</b>	<i>Fusariumoxysporum</i> f. sp.	Tunisie, Lybie, Algérie (présent en Mauritanie)
Le bayoud (Batouddisease )	<i>albedinis</i>	
La maladie des feuilles cassantes (Britteleleafdisease)	Indéterminé Mycoplasmes et/ou viroïdes soupçonnés	Maroc, Libye, Mauritanie (présent en Algérie et en Tunisie)
Le jaunissement mortel (Thal yellowing)	Mycoplasme	Tous les pays de l’Afrique du Nord (présent en Amérique centrale)
Le dépérissement bactérien	<i>Erwiniachrysanthem</i> Mycoplasme	Tous les pays de l’Afrique du Nord (présent en USA récemment signalée en Arabie Saoudite)
Faraoun (blanc)	Indéterminé	Algerie, libye, Maroc et tunisie (présent en Mauritanie)

Souvent isolé à partir des palmes malades, en association avec d’autres champignons en Mauritanie (Sedra, 1999; 2001b ; 2003 a, c) et rarement au Maroc avec le *Diplodia* et *AlternariaouChalara*.

### 7.1.1. La pourriture de l'inflorescence ou Khamedj

Cette maladie est connue dans presque toutes les zones de cultures du dattier. C'est une maladie très grave qui sévit dans les régions phoeniciculture les plus humides ou pendant les années très humides. Dans ce cas, elle peut prendre des allures épidémiques. Elle est causée par un champignon imparfait de l'ordre des Hyphales. Le champignon se conserve à l'état de mycélium latent et les spores semblent n'avoir qu'une faible longévité, c'est une maladie externe qui ne nécessite pas de blessure préalables.

La lutte consiste d'abord à entretenir les palmeraies et les palmiers (après destruction par le feu des inflorescences atteintes) et au traitement des palmiers à l'aide de fongicides. Il semble que certaines variétés soient plus sensibles au Khamedj que d'autres (Bounaga et Djebri, 2009).

### 7.1.2. La pourriture du Cœur (palmier fou)

Appelée aussi Medjnoun (palmier fou), il s'agit d'un dessèchement noir des palmes. Elle a été observée dans différentes régions mais sans être importante comme au Maghreb, en Arabie Saoudite, en Irak, en Mauritanie, en Egypte, aux Emirats et au Bahreïn ainsi qu'aux Etats-Unis. Certaines variétés seraient très sensibles. L'agent causal est la forme imparfaite *Thielaviopsis paradoxa* Sacc. Le champignon peut envahir aussi bien les parties aériennes que les racines du dattier causant: le dessèchement noir des feuilles; la pourriture des inflorescences; la pourriture du cœur et du stipe, la pourriture des bourgeons terminaux. Les moyens de lutte consistent à détruire les feuilles et les inflorescences malades puis à traiter avec un fongicide (dichlor, thiram, bouillie bordelaise...)(Bounaga et Djebri, 2009).

### 7.1.3. La pourriture du bourgeon ou belâat

Ce terme signifie «étouffement» elle est due au *Phytophthora* sp. C'est une maladie peu fréquente, qui a été signalée en Algérie pour la première fois par Maire et Malençon en 1933. Elle est liée souvent aux mauvaises conditions de drainage.

Elle est due à un Phycomycète. La maladie se caractérise par un blanchissement des palmes du cœur et par une pourriture humide à progression rapide. Elle est généralement mortelle. Comme moyens de lutte (Bounaga et Djebri, 2009), recommandent le drainage, la destruction par le feu des sujets malades. Curativement, les traitements cupriques et le manèbe ont donné des résultats intéressants.

### 7.1.4. Le Bayoud

Le bayoud est une maladie cryptogamique vasculaire. Le terme bayoud vient du mot arabe el bayad qui signifie blanc, car cette maladie entraîne le blanchissement des palmes. Cette fusariose cause des dommages considérables chaque année, aussi bien au Maroc que dans le sud ouest de l'Algérie.

Le bayoud est une fusariose vasculaire causée par un champignon microscopique dénommé *Fusariumoxysporumf. sp. albedinis*. Le champignon se trouve dans le sol des palmeraies, à plus d'un mètre de profondeur. Il se conserve plusieurs années grâce aux chlamydozoospores.

**Chapitre II :**

**Fusariose**

**du**

**Palmier dattier**

### 1. *Fusarium oxysporum*

Les mycètes du sol appartenant au genre *Fusarium* provoquent des dégâts très importants aussi bien sur les cultures annuelles que pérennes. En effet, les formes spéciales de l'espèce *Fusarium oxysporum* sont à l'origine d'un grand nombre de fusarioses vasculaires de plantes alimentaires : Palmier dattier, Bananier, Pois, Tomate, Concombre et Melon. Les cultures forestières ne sont pas épargnées.

Le genre *Fusarium* a été décrit par Link en 1809 (Booth, 1985) et sa délimitation actuelle a été faite par Appel et Wollenweber en 1910 et depuis cette année, de nombreux travaux ont été consacrés pour sa taxonomie (Wollenweber et Reinking, 1935 ; Synder et Hansen, 1940; Raillo, 1950; Gordon, 1952; Mesiaen et Cassini, 1968; Booth, 1971; Joffe, 1974; Nelson et al., 1983).

Le nom du genre *Fusarium* est tiré du latin «*fusus* », vu qu'il a des spores en forme de fuseau. Il comporte 9 espèces phytopathogènes. *Fusarium oxysporum* se présente sous deux formes: pathogènes et non pathogènes.

Dans le genre *Fusarium*, l'espèce *oxysporum*, constitue 50 % à 70% des populations «fusariennes» des sols (Guillemat et Montegut, 1958; Gordon, 1965; Joffe, 1974, Mc Mullen et Stack, 1983). Elle est considérée comme colonisatrice primaire du rhizoplan et du cortex racinaire.

L'espèce *oxysporum* peut vivre en saprophyte ou en parasites de vertébrés ou de plantes (Nelson et al., 1981; Rebell, 1981; Bounaga, 1991 ). La forme pathogène semble plus importante dans la rhizosphère des variétés sensibles (Tantaoui, 1993).

Les souches de *F. oxysporum* isolées du sol et incapables de provoquer la fusariose sur des plantes hôtes sont dites non pathogènes ou saprophytes. Ces isolats sont bien représentés dans la rhizosphère (Amir et al., 1985). Grâce à leur capacité de colonisation du sol et de la rhizosphère, les saprophytes sont préconisés et utilisés dans les essais de lutte biologique (Amir, 1981; Alabouvette, 1983; Amir et Sabaou, 1983; Amir et Amir, 1988).

## Chapitre II : Fusariose du Palmier dattier (Bayoud)

### 2. La forme spéciale *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*

Il y a plus de 120 formes spéciales chez *Fusarium oxysporum*, chacune inféodée à une plante hôte particulière (Di Pietro et al., 2003). La reconnaissance de ces formes spéciales, ne fait appel à aucun critère morphologique mais seulement à la pathogénéicité du champignon, dont la détermination doit se faire par la réinoculation du pathogène dans la plante hôte (Bounaga, 1991). Parmi ces formes spéciales, on distingue *albedinis*, qui est responsable de la fusariose vasculaire du Palmier dattier (Le Bayoud) (Bounaga, 1991).

**Tableau 4 :** Quelques exemples des souches de *Fusarium oxysporum* f. sp et leurs plantes hôtes. (Armstrong et Armstrong, 1981; Mac hardy et Beckman 1981; Lamprecht et al., 1986; Summerell et al., 2001; Alves -Santos et al., 2007) (In haminio, 2010).

ESPECE	PLANTE HÔTE
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersic</i>	Tomate
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerincum</i>	Concombre
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>betae</i>	Betterave
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lentis</i>	Lentille
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fabae</i>	Fève
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>	Poids
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciseri</i>	Poischiche
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Melon
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Phaseoli</i>	Haricot
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubens</i>	Banane
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>coffaeae</i>	Café
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>asparagi</i>	Asperge
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>canariensis</i>	Palmier des canaries
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	Palmier dattier
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	Radis
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Oignon
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	Pastèque
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>batats</i>	Patate douce
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i>	Lin

### 3. Position systématique

Selon le Bulletin de l'OEPP (Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes) la classification actuelle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* est :

Domaine :	Eucaryotes
Règne :	<i>Fungi imperfecti</i>
Sous-règne :	<i>Dikarya</i>
Phylum :	<i>Ascomycota</i>
Sous phylum:	<i>Pezizomycotina</i>
Classe :	<i>Sordariomycota</i>
Sous-classe :	<i>Hypocreomycetidae</i>
Ordre :	<i>Hypocréales</i>
Famille :	<i>Nectriaceae</i>
Genre et espèce :	<i>Fusarium oxysporum</i>
Forme spéciale :	<i>albedinis</i>

### 4. Caractères physiologiques du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*

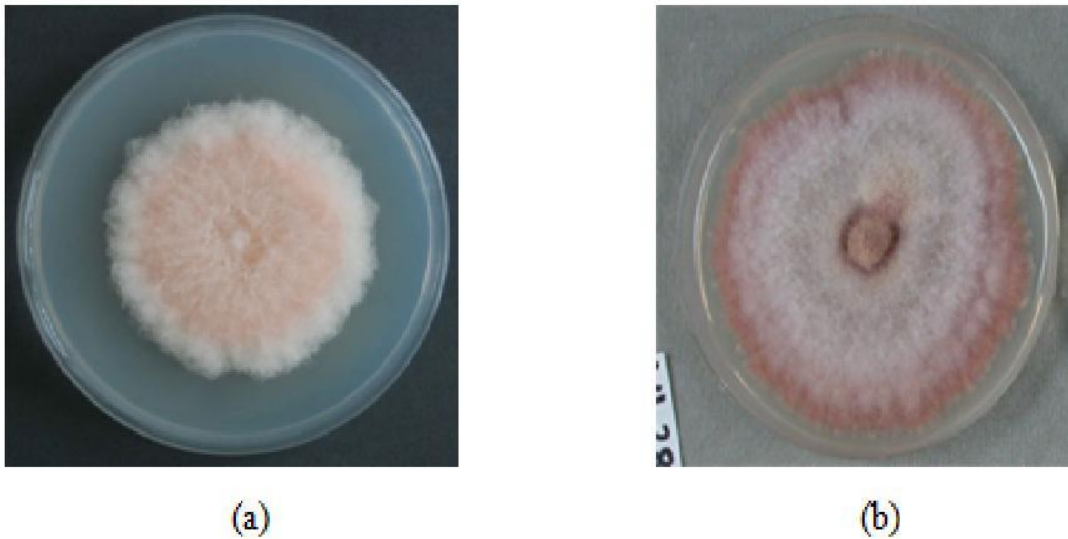
Le milieu favorable au développement de *Fusarium* est à base de pomme de terre (PDA) (Bouhot et Billote, 1964). Sa croissance s'arrête à 37 °C, et est faible entre pH 8,5 et 9,5 et rapide entre pH 5 et 6. Ainsi, les sources de carbone les mieux métabolisées sont la pectine, le mannose, et le glucose.

### 5. Caractères morphologiques du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*

#### 5.1. Caractères macroscopiques

Le *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* est un champignon avec un mycélium aérien qui a une pigmentation variable (Blanchâtre, rosâtre, violette, mauve, orange ou beige) qui est due à la formation d'une multitude de spores en surface par des organes fructifères, ainsi qu'aux variations de la lumière et du milieu de culture (Messaoudi et al., 1989).

En effet, à la lumière, le mycélium peut devenir rose saumon pâle, alors qu'à l'obscurité, il peut être violet foncé (Bounaga, 1970).



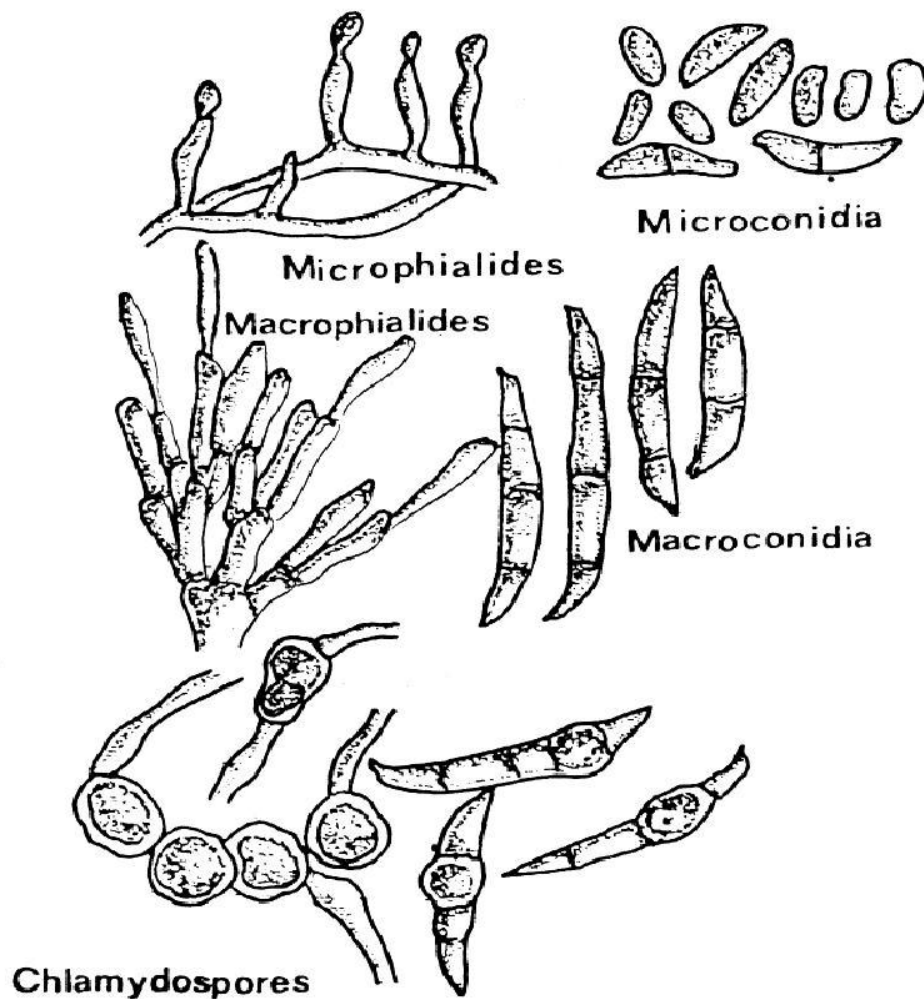
**Figure 3:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* en milieu PDA (potato-dextrose agar)

(a): *Foa* âgé d'une semaine.

(b): *Foa* âgé de deux semaines.

## 5.2. Caractères microscopiques

Ce champignon possède un mycélium cloisonné, fin et régulier en culture jeune. Ce mycélium présente des cellules hypertrophiées en chaîne, d'aspect globuleux en cultures âgées ayant une grande ressemblance avec les chlamydospores, mais sans épaissement de la paroi (Ghomari, 2009).

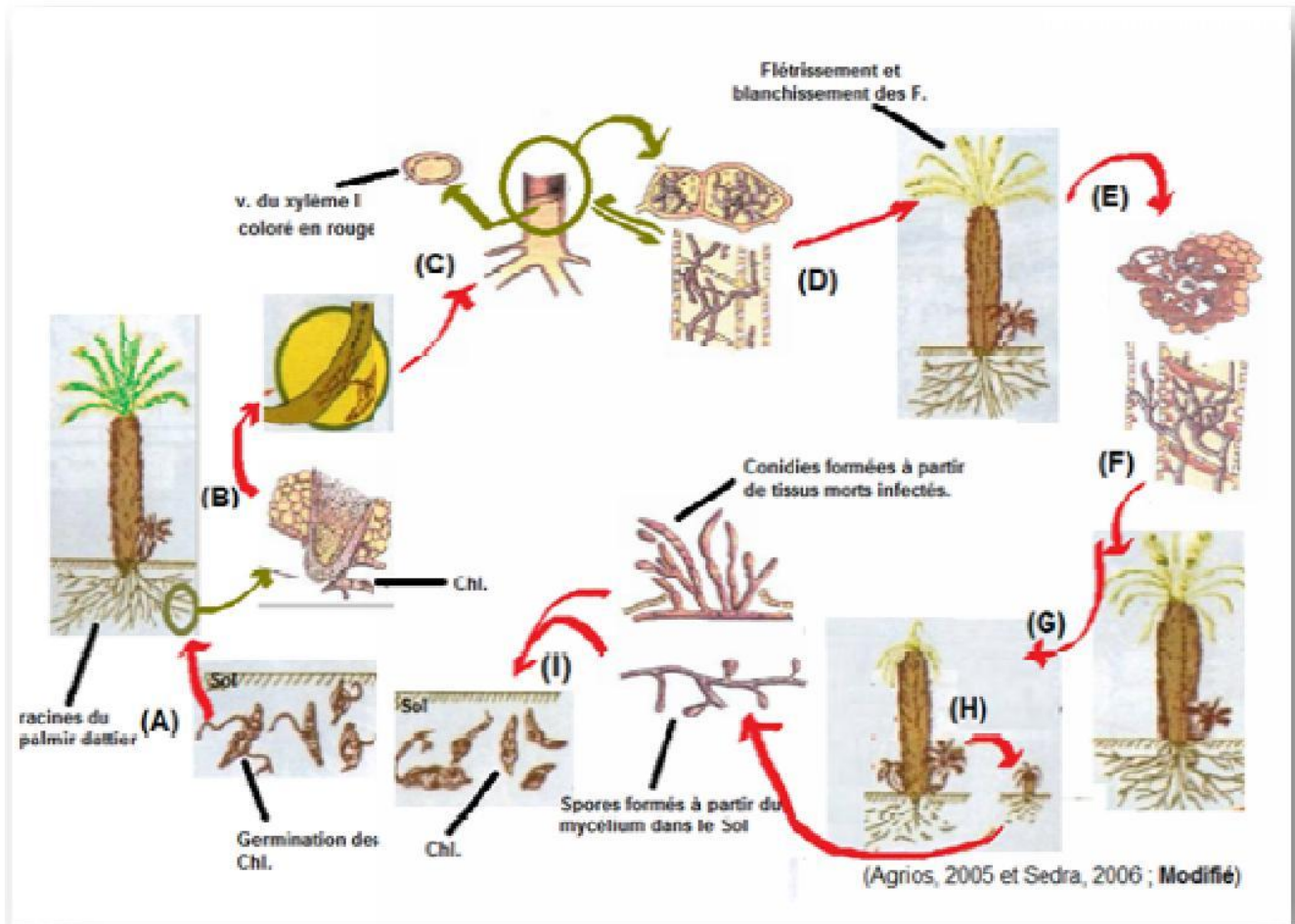


**Figure 4:** Aspect microscopique du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis* (Djerbi, 1983).

### 6. Cycle de vie

L'agent pathogène en absence de conditions favorables forme des chlamydospores au niveau des sols libérés par des débris de tissus de l'arbre mort. Ces structures de résistance survivent pendant de longues périodes (Djerbi, 1988; Sedra, 2003). En présence de conditions favorables au niveau du sol, les chlamydospores germent et mènent une vie saprophyte.

Les chlamydospores rentrent en phase de parasitisme en présence de racines, au niveau de blessures et colonisent la plante (Figure 5). Dans cette phase se détermine l'infection ou l'échec de l'agent pathogène à envahir les vaisseaux vasculaires (Djerbi, 2003).



**Figure 5 :** Cycle infectieux du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal de la maladie du Bayoud (modification apportée depuis Agrios, 2005; Sedra, 2006).

(Chl: chlamydo-spore. V: vaisseaux vasculaires. F:feuilles ou fronde du dattier.

Xylème I: xylème primaire).

- (A): Infestation des racines par le champignon
- (B): Pénétration et envahissement du champignon des vaisseaux vasculaires de racine
- (C): Mycélium et conidies dans les vaisseaux du xylème
- (D): Apparition des symptômes caractéristiques de la maladie
- (E): Etat avancé de la maladie où le champignon bouche les vaisseaux vasculaires de part sa propagation et la formation de gommages (thyllose)
- (F): Palmier dattier à un état avancé de l'infection
- (G): Mort du palmier dattier
- (H): Détérioration des parties infectées de l'arbre et dissémination du champignon, dans le sol
- (I): Cycle saprophyte du champignon dans le sol

### 7. Historique et progression du bayoud

Plusieurs auteurs s'accordent sur l'origine Marocaine de la maladie (pays endémique), où elle a été observé pour la première fois dans la vallée du Draa ; au Nord de Zagora avant 1870. A cette époque, toutes les palmeraies qui bordaient l'Oued du Draa ont été ravagées (Malençon, 1934; Perreau Leroy, 1958; Toutain, 1965; Bulit et *al.*, 1967; Djerbi, 1982).

Par la suite, le «Bayoud» progresse vers l'Ouest et atteint Foum El Hassan en 1860. Dès 1898, ce fléau atteint les palmeraies de Figuig et Beni Ounif situées à la frontière Algéro-Marocaine (Pereau-Leroy 1958).

Enfin, et plus récemment, les palmeraies de Ghardaïa et d'El Goléa, sont contaminées à leur tour en 1965 et 1978 (Djebri, 1982; Brac De La Perrière et Benkhalifa, 1991). Parallèlement, certaines palmeraies algériennes sont indemnes, notamment les palmeraies de Kerzaz, de Timimoune et de la Station de Recherche de l'I.N.R.A. d'Adrar (Brac De La Perrière et Benkhalifa, 1991).

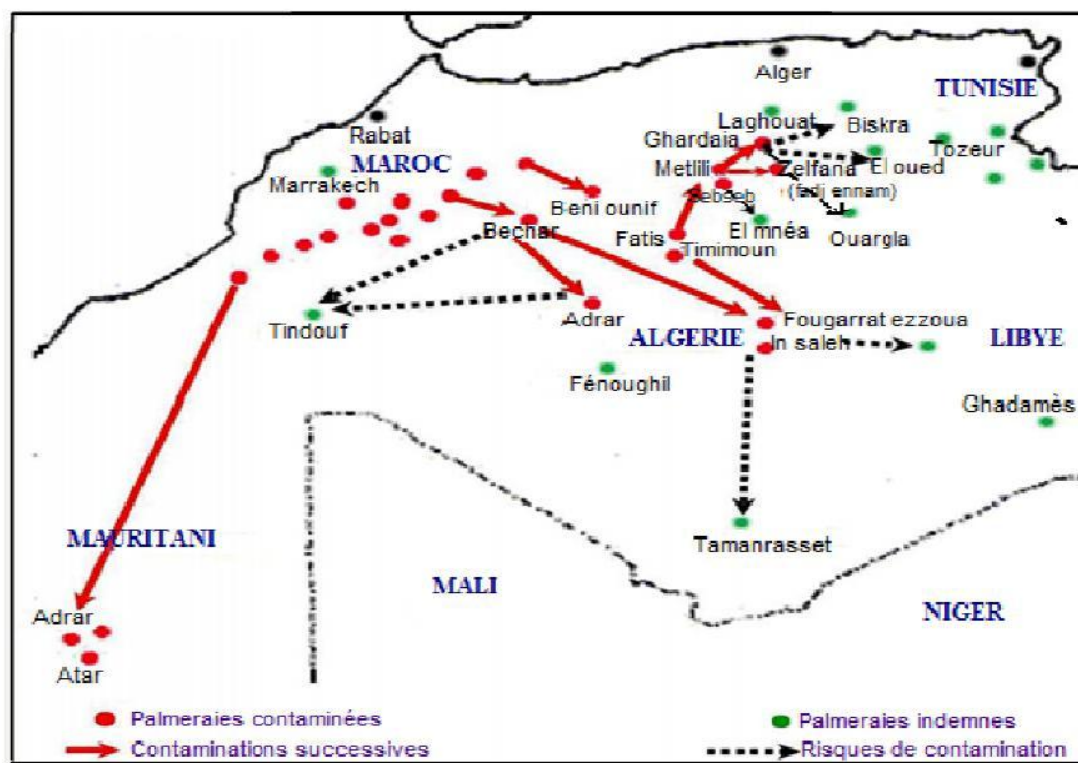


Figure 6: Distribution du bayoud en Afrique du nord (Tirichine, 2002)

### 7.1. Symptômes de la maladie

Les premiers symptômes externes du bayoud se manifestent par le dessèchement d'une ou plusieurs feuilles de la couronne moyenne (Figure 7). Le dessèchement est très caractéristique: les folioles d'un côté se dessèchent l'une après l'autre de bas en haut en se repliant sur le rachis et prennent une teinte blanchâtre, puis le dessèchement gagne les folioles du côté opposé. Une nécrose longitudinale, brune, parcourt la nervure principale de la palme.



**Figure 7:** Symptômes externes du bayoud (Bessedik, 2006)

#### 7.1.1. Symptômes externes

Le bayoud attaque aussi bien les palmiers jeunes qu'adultes. Les premiers symptômes de la maladie, visibles par un œil averti, font leur apparition sur une ou plusieurs feuilles de la couronne moyenne. Les feuilles affectées prennent une teinte plombée (gris cendré) et se fanent d'une façon particulière (Figure 8): les pennes situées d'un côté de la feuille commencent à blanchir, et la maladie progresse de la base vers l'apex. Le flétrissement commence de l'autre côté, de l'extrémité de la feuille vers sa base, jusqu'à la mort de la feuille (Djerbi, 1983; Imi, 1994).

Une coloration brune se manifeste dans le sens de la longueur sur le côté dorsal du rachis au cours de ce processus de coloration et de dépérissement des pennes, elle correspond au passage du mycélium dans les faisceaux vasculaires du rachis. En suite, la feuille va prendre une forme arquée, similaire à une feuille humide, et prend le long du tronc. Ce processus peut durer de quelques jours à plusieurs semaines (Djerbi, 1983; Imi, 1994).

## Chapitre II : Fusariose du Palmier dattier (Bayoud)

Dans tous les cas, la maladie avance toujours vers le cœur de l'arbre et l'arbre meurt quand le mycélium atteint le bourgeon terminal. Finalement, les rejets à la base de l'arbre sont attaqués (Djerbi, 1983; Imi, 1994).



**Figure 8 :** Symptômes unilatéraux sur une palme (Bessedik, 2006).

### 7.1.2. Symptômes internes

Le déracinement d'un palmier dattier malade permet d'observer un nombre réduit de racines malades rougeâtres, elles représentent la porte pour la pénétration du champignon (Rahmania, 1988). De plus, des coupes transversales au niveau du tronc ou des rachis (Figure 9), mettent en évidence une coloration brune rougeâtre des vaisseaux conducteurs, témoignant le passage du champignon le long du stipe (OEPP, 1994).



**Figure 9:** Symptômes internes du bayoud (flétrissement latéral) (Bessedik, 2006).

### 7.2. Moyens de lutte

Plusieurs axes de recherches sont menés dans plusieurs pays du monde pour lutter contre ce fléau qui menace le secteur phoenicicole, notamment sur terrain et au laboratoire.

Les différents volets de lutte sont:

## Chapitre II : Fusariose du Palmier dattier (Bayoud)

---

### 7.2.1. Mesures Prophylactiques (Législation et Police Phytosanitaire)

Il s'agit essentiellement d'empêcher le transport de matériel végétal contaminé d'une palmeraie atteinte à une autre saine.

### 7.2.2. Eradication Des Foyers de Bayoud

Les mesures prophylactiques constituent un moyen de lutte préventive ayant pour but de limiter la dissémination du Bayoud par l'interdiction d'échange de matériel végétal entre les palmeraies infectées et celles indemnes (Louvet et *al.*, 1976). Par ailleurs, et dans une palmeraie atteinte et après délimitation du foyer, les arbres sont arrachés et incinérés sur place. Le sol est par la suite stérilisé à la chloropicrine.

### 7.2.3. Lutte Culturelle

Elle consiste à placer l'agent pathogène dans de mauvaises conditions. Malheureusement, les meilleures conditions de culture sont les mêmes pour la prolifération du pathogène.

En effet, la maladie est moins présente en conditions d'irrigation réduites, ainsi que dans les sols pauvres en phosphore et magnésium (Woltz et Johnes, 1981).

Dans les parcelles contaminées, il faut éviter les cultures du henné et de la luzerne qui nécessitent une irrigation abondante favorable à la maladie et qui sont porteurs sains de l'agent pathogène (Bulit et *al.*, 1967).

En outre, le contact souterrain entre arbres voisins doit être évité par des méthodes modernes d'irrigation et de plantations de palmiers dattiers (Louvet, 1991).

### 7.2.4. Lutte chimique

Ce moyen de lutte fait appel à l'utilisation de fongicides à réaction systémique. La chloropicrine, le bromure de méthyle et le vapam et surtout le mélange chloropicrine/bromure de méthyle ont été expérimentés sur le terrain (Chikh Aissa A, 1991).

Si l'application de ces fongicides a donné des résultats encourageants pour la lutte contre ce pathogène (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*), l'utilisation répétée de ces produits de synthèse entraîne malheureusement souvent la pollution de l'environnement et l'apparition chez le parasite de nouvelles souches résistantes et plus virulentes (Ozbay et Newman, 2004).

## Chapitre II : Fusariose du Palmier dattier (Bayoud)

---

Cependant, la désinfection du sol est très coûteuse et difficile, ainsi, la lutte chimique n'est envisageable que pour les foyers primaires (point de départ d'une nouvelle infection dans une région saine).

Les effets toxiques de ces produits sont souvent signalés pour l'homme et l'animal (Messiaen et Lafon, 1970) et pour le déséquilibre biologique du sol.

### 7.2.5. Lutte Génétique

En vue de reconstituer les palmeraies détruites par le Bayoud la lutte génétique a pour but de sélectionner et de créer de nouvelles variétés résistantes et de bonne qualité dattière.

Actuellement le moyen le plus préconisé est l'utilisation des variétés résistantes tels que : Tekerboucht et Agharas.

Cependant, ce moyen de lutte présente des inconvénients. En effet, en plus de la rareté des cultivars résistants, Il faut attendre 10 ans pour s'assurer de leur résistance (Saaidi, 1979). Ainsi, la culture *in vitro* par la multiplication et ou l'amélioration de la qualité du palmier pourrait palier à cette contrainte. En effet, ce moyen de biotechnologie permet d'une part une reproduction conforme des cultivars et d'une autre part une création de nouveau cultivars résistant et de bonne qualité dattière grâce à l'hybridation somatique (Yakoub-Bougdal, 1987; Yakoub-Bougdal, 2005).

### 7.2.6. Lutte Biologique

La lutte biologique contre le bayoud consiste en l'utilisation de microorganismes antagonistes au pathogène et la recherche de sols résistants. Cette voie reste au stade de l'expérimentation, elle a été développée au Maroc et En Algérie mais les cas d'utilisation à une grande échelle sont très rares (Amir, 1991).

Malgré l'apparence séduisante de l'utilisation de l'antagonisme microbien pour la lutte biologique contre la fusariose, ce procédé se révèle très difficile à mettre en pratique particulièrement lorsqu'il s'agit d'un «arbre» comme le palmier dattier (Amir et Amir, 1988).

### 7.2.7. Lutte physique

Pour lutter contre ce pathogène, on procède à la taille des palmes fortement attaquées et leur incinération, surtout chez les jeunes palmiers ce qui permet de réduire notablement le niveau de pullulation du ravageur (Djerbi, 1994). En cas de forte attaque dans les jeunes plantations,

## Chapitre II : Fusariose du Palmier dattier (Bayoud)

---

il est conseillé d'incinérer les arbres sans risque de les tuer; ce procédé a donné d'excellents résultats (Munier, 1973).

### **7.2.8. Lutte préventive**

La lutte préventive consiste à entretenir convenablement la palmeraie et la débarrasser de tous les éléments susceptibles d'héberger l'acarien (mauvaises herbes, déchets divers, ...) et ce grâce à la sensibilisation et laide des phoeniculteurs d'une part pour mieux connaitre la maladie (sa progression et sa surveillance) et d'autre part, pour veiller à n'utiliser que des rejets sains pour la plantation et d'interdire les échanges de matériel végétal entre les palmeraies.

## **2<sup>ème</sup> PARTIE :**

### **Etude Expérimentale**

# **Chapitre III :**

## **Matériels et Méthodes**

### **1. Cadre de l'étude :**

L'étude a été menée à l'INRAA (Institut Nationale de la Recherche Agronomique d'Algérie), à la station expérimentale « Mehdi Boualem » de Baraki. Elle rentre dans le cadre du programme de recherche de la division.

### **2. Déroulement de l'étude :**

L'étude a été faite à la division de biotechnologie et d'amélioration des plantes de l'INRA d'Algérie (INRAA).

### **3. Période et type d'étude :**

C'est une étude perspective qui s'est déroulée sur une période de 7 mois (mars – septembre 2015). Elle inclut, d'une part, l'étude du degré d'agressivité du champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent de la fusariose du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), par l'inoculation de feuilles détachées du palmier dattier et d'autre part, la caractérisation moléculaire du champignon.

### **4. Matériel biologique :**

Le matériel biologique utilisé dans notre étude est représenté par des feuilles du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Il s'agit de 3 cultivars (Deglet Nour , Takarboucht et Tagaza). Nous avons également utilisé 25 souches de *Foa*.

#### **4.1. Matériel fongique :**

Les souches de *Foa* utilisées appartiennent à la mycothèque de la division. Elles ont été isolées à partir de rachis du palmier dattier. Elles sont conservées à 4°C sur milieu de culture à base de pomme de terre (PDA). Les souches de *Foa* seront utilisées pour inoculer des feuilles du palmier dattier. Des codes ont été attribués aux souches *Foa* et le lieu de leur isolement (Tableau 5).

**Tableau 5 :** Codes des souches *Foa* et le lieu de leur isolement

N°	N°Souche	Lieu d'isolement
1	1	<i>In salah</i>
2	5	<i>In salah</i>
3	14	<i>In salah</i>
4	23	<i>Ghardaïa</i>
5	24	<i>In Salah</i>
6	27	<i>In Salah</i>
7	28	<i>Ghardaïa</i>
8	31	<i>Ghardaïa</i>
9	38	<i>Ghardaïa</i>
10	40	<i>Ghardaïa</i>
11	43	<i>Ghardaïa</i>
12	45	<i>Ghardaïa</i>
13	48	<i>Ghardaïa</i>
14	50	<i>Ghardaïa</i>
15	65	<i>Adrar</i>
16	68	<i>Adrar</i>
17	70	<i>Adrar</i>
18	75	<i>Adrar</i>
19	76	<i>Adrar</i>
20	91	<i>Ghardaïa</i>
21	93	<i>Ghardaïa</i>
22	94	<i>Adrar</i>
23	96	<i>In Salah</i>
24	105	<i>Adrar</i>
25	113	<i>Adrar</i>

#### 4.2. Matériel végétal:

Pour évaluer l'agressivité des souches de *Foa*, nous avons utilisé des feuilles détachées saines du palmier dattier de 3 cultivars (Dégelet Nour , Takerbucht et Tagaza).

Les deux cultivars Deglet Nour et Tagaza sont utilisés pour leur sensibilité au bayoud.

Le cultivar Takerbucht est utilisé comme témoin en raison de sa résistance pour le bayoud.

### 5. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés contiennent les éléments nécessaires au développement des champignons du genre *Fusarium*.

#### 5.1. Milieu PDA solide :

Le milieu de culture PDA (Potato-Dextrose-Agar) est favorable pour la croissance des champignons. Il est à base d'extrait de pomme de terre, de sucre sous forme de dextrose et de la gélose (Agar) (Annexe 5).

Après avoir fait sortir le milieu de l'autoclave, nous le faisons couler dans des boîtes de Pétri sous la hotte à flux laminaire, afin de limiter au mieux la contamination.

Nous avons en suite additionné la streptomycine à une dose 100 mg/L (Annexe 5).

#### 5.2. Milieu de Pikovskaya (1948)

Le milieu PVK solide  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  a été effectué pour le test de solubilisation du phosphate. Il est composé d'extrait de levure, phosphate bicalcique, KCl,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , Glucose, Agar,  $\text{MnSO}_4$  en trace,  $\text{FeSO}_4$  en trace (Annexe 5).

Après autoclavage, nous avons additionné la streptomycine à une dose de 100 mg/L.



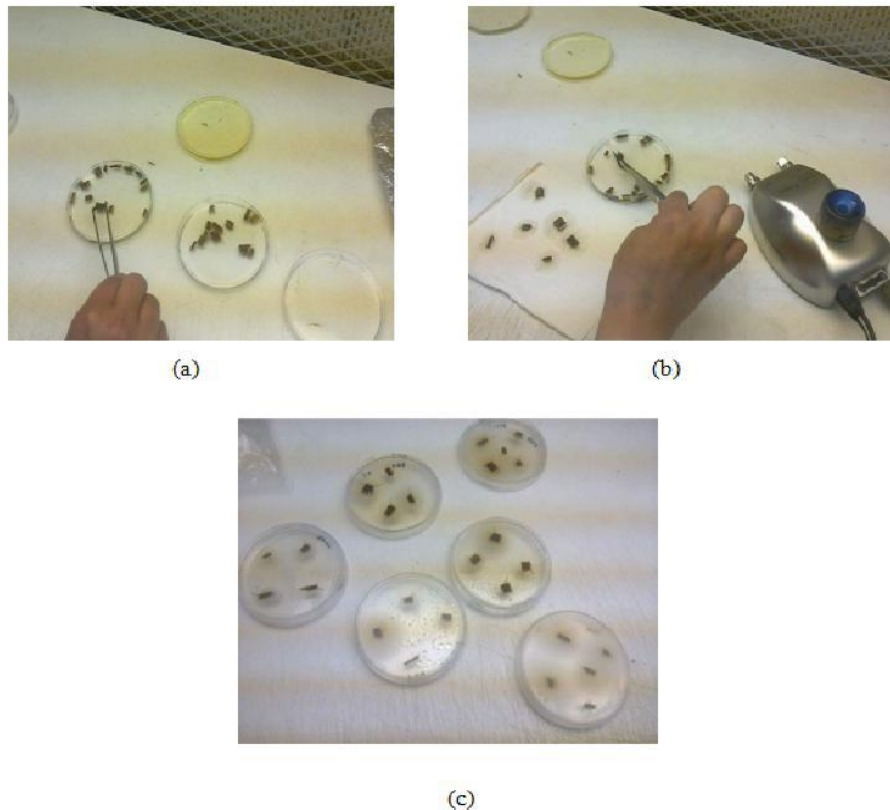
**Figure 10 :** Milieu de culture Pikovskaya sur agitateur thermique

### 6. Méthodologie

#### 6.1. Lancement des cultures

##### 6.1.1. Isolement et purification des souches

Pour certaines souches, en raison de leur infection, nous avons procédé à leur ré-isolément à partir du même matériel végétal infecté (rachis), réalisé par dépôt sur milieu de culture PDA de fragments de rachis préalablement désinfectés par trempage dans l'hypochlorite de sodium (eau de javel) à 12% (Annexe 4) pendant 5 mn. L'objectif est d'éliminer les saprophytes et les bactéries. Nous avons ensuite rincé abondamment à l'eau distillée stérile (au moins 3 rinçage successifs) et séché les rachis. Les boîtes d'isolement sont incubées dans l'étuve à 28°C après les avoir paraffinées (Figure 11).



**Figure 11:** Les étapes d'isolement de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* à partir des rachis.

- (a) : Trempage dans de l'hypochlorite de sodium et rinçage à l'eau distillée stérile
- (b) : Séchage des fragments de rachis
- (c) : dépôts des rachis sur le milieu PDA

### 6.1.2. Purification

Les cultures isolées ont été purifiées par des repiquages successifs sur milieu PDA jusqu'à l'obtention d'une culture pure pour chaque souche. Les boîtes de Pétri sont incubées à 28°C dans l'étuve. Les nouvelles cultures obtenues sont conservées à 4°C.

Les isolats de la collection sont conservés jusqu'alors par repiquages successifs.

Pour notre étude, et dans des conditions stériles sous la hotte et un rayon de 30 cm autour de la flamme d'un bec benzène, nous avons prélevé un bout du milieu contenant le champignon (à partir des souches conservées) sur un nouveau milieu PDA. Après une semaine d'incubation, des filaments mycéliens apparaissent autour des petits fragments de culture.

### 7. La culture monospore :

La technique de la culture monospore permet d'obtenir une culture pure à partir des spores fongiques par étalement sur milieu gélosé.

Les souches repiquées sur le milieu PDA solide et laissées se développer sur la totalité de la surface de la boîte pendant 10 jours ont été utilisées pour l'isolement et la culture monospore.

Nous avons versé 2 ml d'eau distillée stérile sur les cultures âgées de 10 jours en agitant la boîte de Pétri pour suspendre les spores. Nous avons obtenu une suspension sporale de chaque souche récupérée dans des eppendorfs, pour réaliser des suspensions dilutions. A partir de la dilution ( $10^{-3}$ ), nous avons prélevé 100 µl que nous étalons à l'aide d'une pipette Pasteur stérile sur milieu gélosé.

Après 24h d'incubation à 28 °C et à l'aide d'un stéréo-microscope (Annexe 3), nous avons procédé au repérage et à la délimitation des spores en germination. Pour chaque souche, 3 spores sont prélevées délicatement et déposées dans une boîte de Pétri contenant le milieu PDA, et incubées à 28°C.

### 7.1. Identification

L'identification des isolats s'est reposée sur une observation globale intégrant à la fois la morphologie des cultures et principalement l'observation microscopique des spores après 8 jours d'incubation.

### 7.1.1. Etude macroscopique

Cette étude c'est basée sur l'observation des cultures à l'œil nu précisément l'aspect et la couleur.

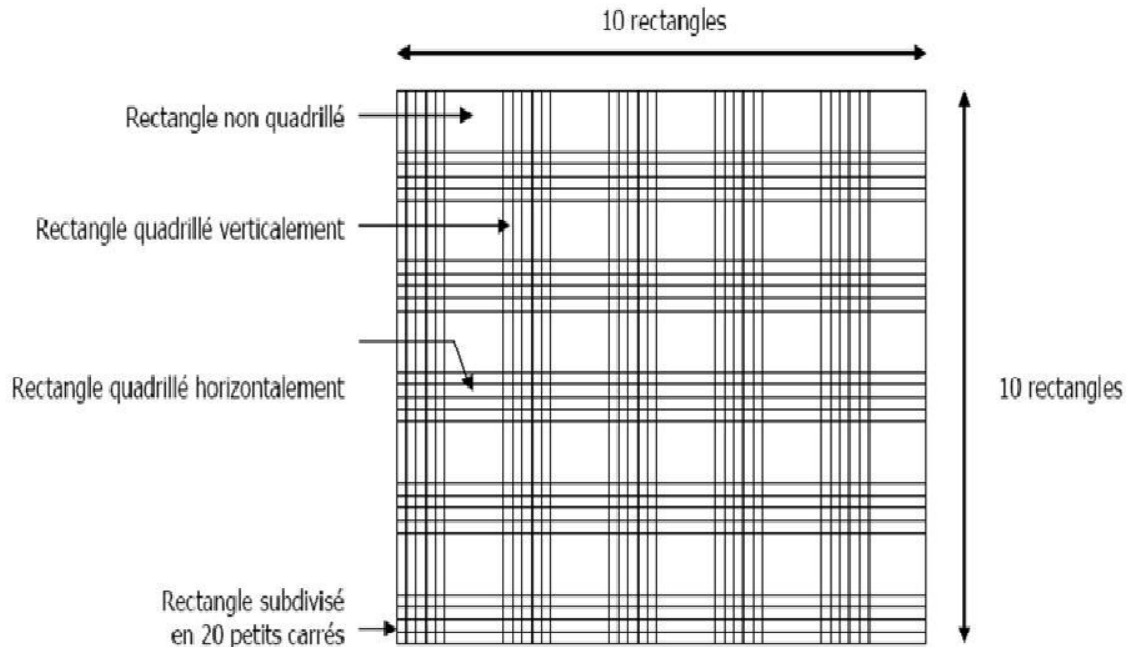
### 7.1.2. Etude microscopique :

L'étude microscopique est précédée d'une étape de coloration avec le bleu coton (bleu de méthyle) qui permet de voir l'aspect morpho-tinctoriale du mycélium et/ou des spores.

L'observation des hyphes mycéliens et/ou des spores du champignon *Foa* s'est effectuée sous grossissement  $\times 40$ .

## 8. Comptage des spores sur cellule Malassez

La cellule Malassez est un hématimètre qui permet de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution (Annexe 2). Il s'agit d'une lame en verre sur laquelle un quadrillage de 25 rectangles contenant eux même 20 petits carrés. Le volume correspondant au quadrillage total est égal à  $1\text{mm}^3 = 10^{-6}\text{dm}^3$ .



**Figure 12 :** Schéma du quadrillage de l'hématimètre de Malassez.

### 8.1. Préparation de l'inoculum

Après préparation des cultures dans un milieu PDA incubé à 28°C pendant 7 jours, nous avons versé 2 ml d'eau distillé stérile sur chaque souche, en agitant la boîte de Pétri pour suspendre les spores. Les solutions obtenues sont des solutions mères que nous avons diluées à 1/10, lorsque l'une d'elle a un nombre de spores très élevé.

Pour le dénombrement, une goutte de la suspension sporale est placée entre lamelle et la cellule de Malassez. Après avoir attendu quelques minutes, pour que les cellules sédimentent, nous avons pu compter le nombre de cellules dans 10 rectangles (quadrillés), le volume d'un rectangle quadrillé étant de 0,01µl.



**Figure 13 :** Préparation de la suspension sporale de chaque isolat pour le comptage sur cellule Malassez.

### 9. Inoculation des feuilles détachées par *Foa*

Après avoir dénombré les solutions sporales sur cellule Malassez, nous avons préparé l'inoculum en ajustant les solutions obtenues avec de l'eau distillée stérile puis étudié les relations hôte-parasite sur trois cultivars de palmier-dattier : l'un sensible et les deux autres résistants.

Les feuilles des 3 cultivars utilisés ont été coupées, de sorte que l'on puisse les placer dans des eppendorfs après leur stérilisation par un bain d'hypochlorite de calcium et rinçage au moins 3 fois à l'eau distillée stérile, puis séchées (Figure 14 a).

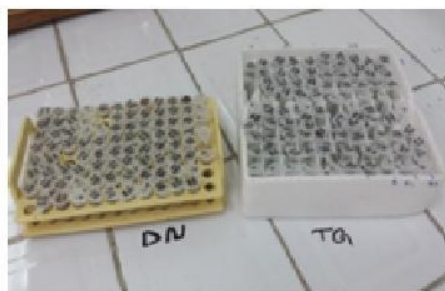
- 50 eppendorfs contiennent 100 ml d'eau distillée stérile et une feuille du cultivar Takarboucht chacun, ce sont les témoins (Figure 14 b et c).

- 25 eppendorfs contiennent 100 ml de la solution ajustée propre à chaque souche et une feuille du cultivar Tagaza (Figure 14 b et c).

- 25 eppendorfs contiennent 100 ml de la solution ajustée propre à chaque souche et une feuille du cultivar Deglet Nour (figure 14 b et c).



(a)



(b)



(c)

**Figure 14 :** Préparation des feuilles détachées pour l'inoculation avec les ajustements de la solution sporale des souches.

(a): Stérilisation des feuilles détachées coupées

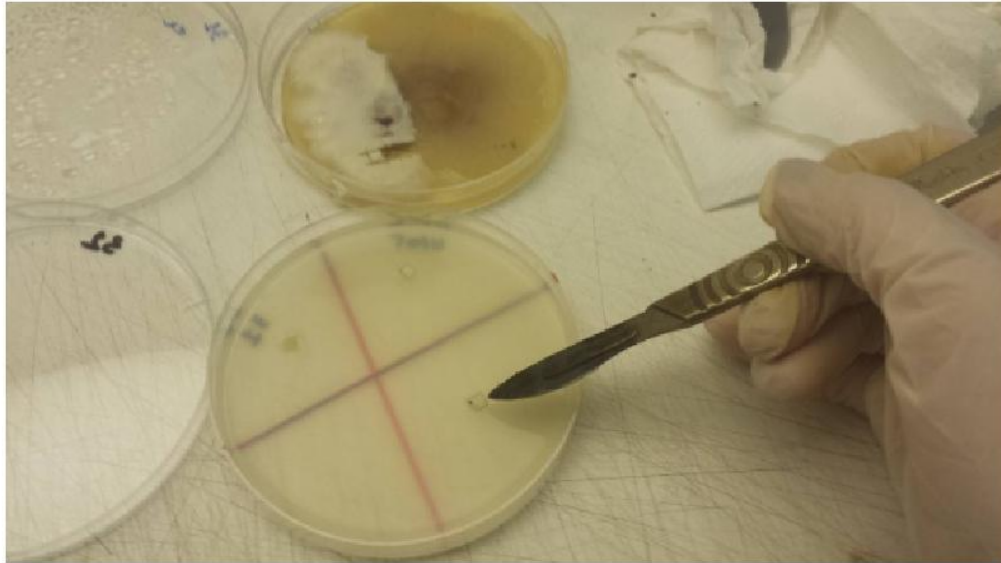
(b) et (c): Feuilles détachées inoculées dans des eppendorfs

### 10. Solubilisation du phosphate :

Le phosphore (P) est un macronutriment essentiel pour la croissance et le développement des plantes mais aussi un important élément nutritif limitant cette croissance.

A partir des souches conservées nous avons prélevé un bout de milieu contenant le champignon sur milieu PDA puis le déposé sur milieu PVK, chaque de Pétri contient une souche répétée 4 fois. La lecture des résultats se fait après 72h d'incubation.

Les résultats sont exprimés par la mesure du diamètre de la zone transparente autour de la colonie (diamètre total moins le diamètre de la colonie) permettant ainsi d'évaluer l'intensité de la solubilisation  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .



**Figure 15 :** Inoculation du milieu Pikovskaya par *Foa*

- **Indice de solubilisation de phosphate**

$$IS \text{ (Indice de Solubilisation)} = \frac{\text{Diamètre de l'halo} \times 100}{\text{Diamètre de la colonie}}$$

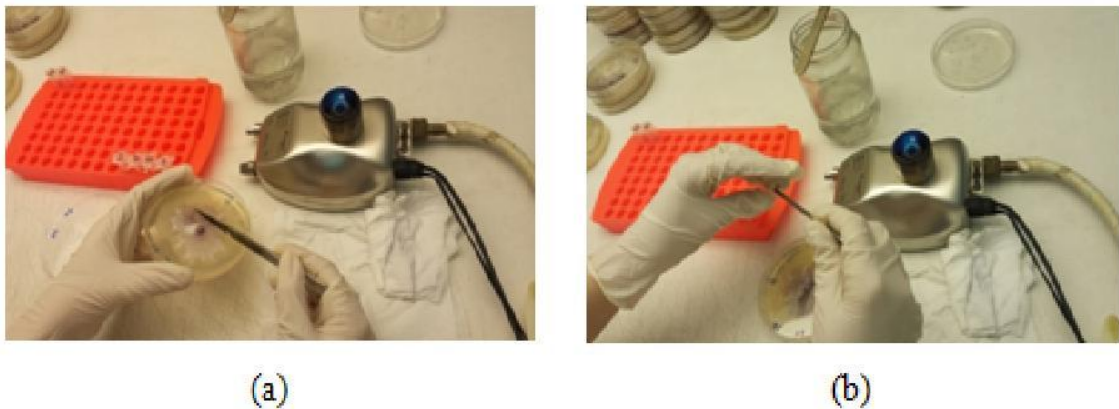
**Lecture :**

- La présence d'un halo autour du champignon indique que les phosphates ont été solubilisés par celui-ci (phosphore +).
- L'absence d'un halo transparent autour du champignon indique que les phosphates n'ont pas été solubilisés par celui-ci (phosphore -).

## **11. Extraction d'ADN génomique**

### **11.1. Préparation du matériel vivant**

Les isolements ont été faits à partir de cultures sur milieu PDA. Les boîtes de Pétri contenant les différentes souches de *Fusarium* ont été placées dans l'étuve à 28°C (Annexe 1). Après une semaine d'incubation, le mycélium s'est suffisamment développé et envahit toute la surface du milieu. Il est récupéré par grattage de la surface du milieu PDA à l'aide d'une lame de scalpel, la quantité de mycélium obtenue est mise dans des tubes eppendorfs (Figure 16).



**Figure16** : Obtention du matériel fongique pour l'extraction d'ADN.

(a): Grattage du *Foa* de la surface du milieu PDA.

(b): Mise du matériel fongique récupéré dans des eppendorfs.

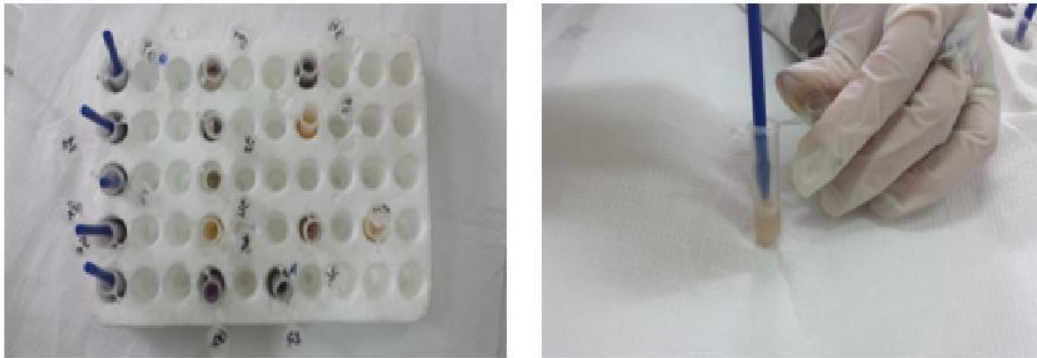
### 11.2. Extraction de l'ADN

La méthode d'extraction au phénol/chloroforme a été utilisée pour l'extraction de l'ADN génomique. Le mycélium de chaque souche est broyé dans des tubes eppendorfs de 2 ml contenant 50  $\mu$ l de tampon de lyse TES, à l'aide d'une tige en plastique stérile (une tige en plastique pour chaque souche).

Après broyage, 70  $\mu$ l de la solution CTAB et 140  $\mu$ l de NaCl 5M sont ajoutés.



**Figure 17** : Extraction d'ADN avec le CTAB et NaCl.



**Figure 18 :** Broyage du matériel fongique avec le tampon de lyse au CTAB.

Cette étape sert à réduire les liaisons disulfures (S-S), à dénaturer les protéines et à isoler l'ARN pour éliminer la ribonucléase libérée lors de la lyse. Les échantillons sont incubés pendant 30 mn 65°C au bain Marie.

500 µl de Chloroforme-isoamyle alcool (24 :1) sont ajoutés dans chaque Eppendorf puis mixés et centrifugés à 10000 rpm (Annexe 3) pendant 10 mn. Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube Eppendorf de 2 ml.



**Figure 19 :** Récupération de l'ADN par le Chloroforme-isoamyle.

### 11.3. Précipitation d'ADN

A la phase aqueuse récupérée, 1000 µl d'éthanol 95% (Annexe 4) et 80 µl NaCl sont ajoutés pour la précipitation de l'ADN. Après 10mn d'incubation à -20°C les échantillons sont centrifugés à 10000 rpm pendant 10 mn puis le surnageant est soigneusement jeté (Figure 19).

### 11.4. Purification d'ADN

10000 µl d'éthanol 80 % (Annexe 4) sont rajoutés à chaque tube puis centrifugés à 10000 rpm à 4°C pendant 5mn. On répète l'opération 2 à 3 fois (Figure 20).

L'éthanol est éliminé soigneusement avec une micropipette sans décoller le culot d'ADN. Les culots obtenus sont séchés sous la hotte. Après séchage, l'ADN est suspendu dans 50  $\mu$ l d'eau ultra pure. 5  $\mu$ l d'RNase sont rajoutés. L'ADN est conservé à 4°C.



**Figure 20 :** Centrifugation du surnageant à 10000 rpm à 4°C.

### 12. Quantification d'ADN

La quantification de l'ADN ainsi que les tests de qualité ont été réalisés sur gel d'agarose à 0.5 % (Annexe 5) puis par spectrophotométrie.

#### 12.1. Qualité d'extraction sur gel d'agarose

Pour s'assurer de la qualité et de la spécificité de l'amplification, le test a été réalisé sur un gel d'agarose à 0,5%, en présence d'un marqueur de taille 1 Kb dans une solution 0,5X TBE (Annexe 4). Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons, à savoir 3 $\mu$ l d'ADN et 3 $\mu$ l de bleu d'agarose dans chaque puit. La migration se fait sous une tension de 110 volts.

La révélation des bandes a été réalisée avec le BET (Bromide Ethidium) puis visualisée sur une lampe UV Trans-illuminateur (Annexe 2).



**Figure 21:** Migration d'ADN sur gel d'agarose sous une tension de 110 volts.

### 12.2. Quantification par spectrophotométrie « Biophotomètre »

Après étalonnage du spectrophotomètre, une dilution de 1/9 ème de l'ADN a été réalisée pour effectuer une lecture de la concentration à une longueur d'onde de  $\lambda = 260/280$  nm. L'absorbance est ainsi mesurée. Suite à cette lecture, des dilutions ont été effectuées pour obtenir une concentration finale de 10 ng/ $\mu$ l nécessaire pour un bon déroulement de la PCR.



**Figure 22 :** Quantification par spectrophotométrie

### 13. La réaction de polymérisation en chaîne PCR/ISSR

La technique ISSR, basée sur la réaction PCR, utilise des amorces à simple séquence répétée pour amplifier les régions ou nucléotides présents dans les espaces inter-microsatellites (Zietkiewicz et *al.*, 1994; Kahl, 2001).

Pour notre étude nous avons utilisé deux amorces ISSR (Tableau 6).

La PCR permet l'amplification spécifique d'un fragment d'ADN cible en présence d'oligonucléotides, le principe consiste en la répétition d'un cycle triphasique. L'amplification a été réalisée selon le programme du Tableau 8, dans un système 96 puits PCR GeneAmp 9700 thermocycler (AppliedBiosystems).

**Tableau 6 :** Séquence ISSR utilisées

Locus	Séquence
H290 21-2667-1/2	ACC ACCACCACCACCACC CC
H290 21-2667-2/2	CCA TGA TGATGATGATGA TG

### Chapitre III: Matériels et Méthodes

La réaction PCR est réalisée dans un volume de 25  $\mu$ l. Pour chaque amplification la réaction est composée de : tampon 2X, dNTPs et  $MgCl_2$ . A ce mix on ajoute l'amorce ISSR1, l'ADN matrice et la Taq DNA polymérase, le volume final est ajusté à 25  $\mu$ l par l'eau ultra pure selon le tableau (7) suivant:

**Tableau 7 :** Composition du mélange réactionnel de la PCR/ISSR

Réaction PCR (25 $\mu$ l)	Volume de prise en $\mu$ l
(1X) PCR buffer	5
$MgCl_2$	2
dNTPs	2
Primer (Amorce)	1.25
Taq polymérase	0.2

**Tableau 8:** Programme PCR

Étapes	Temps (mn)	Températures ( $^{\circ}C$ )
Pré-dénaturation	1 cycle 4 mn	94 $^{\circ}C$
Dénaturation :	30 s	94 $^{\circ}C$
Hybridation d'amorce	45 s	56 $^{\circ}C$
Elongation	2 mn	72 $^{\circ}C$
Finalisation d'élongation	7 mn	12 $^{\circ}C$



**Figure 23:** Mélange réactionnel de la PCR/ISSR dans la plaque 96 puits

### 13.1. Analyse des produits de PCR:

5  $\mu$ l de bleu d'acrylamide ont été ajoutés aux produits de la PCR, puis déposés sur un gel d'acrylamide à 0,1 % (Annex 5) pour une meilleure résolution des bandes. Cette étape initiée par le traitement des plaques de verre, qui doivent être bien propres en les lavant avec le détergeant et en les rinçant avec l'eau de robinet, ensuite elles subissent un traitement avec le NaOH 1N pendant 2 mn suivi d'un rinçage. Le coulage du gel est effectué après avoir bien serré les plaques. Une fois le gel polymérisé, le peigne est ôté et les échantillons sont déposés. La migration s'est déroulée sous une tension de 200 Volts pendant 2 heures.

La visualisation des bandes a été réalisée dans des bains de BET ( Bromide d'éthidium)

L'appareil Trans-illuminateur « Bio Rad » a été utilisé pour la visualisation des amplifias ISSRs.

## **Chapitre IV :**

### **Résultats et discussion**

### 1. Résultats

#### 1.1. Isolement du *Foa*

Après la période d'incubation, nous avons procédé à l'isolement de nouvelles souches à partir des rachis. L'aspect des souches est ras pour l'ensemble des cultures (Figure 24).



**Figure 24 :** Isolement du champignon à partir des rachis infectés

#### 1.2. Caractérisation des isolats

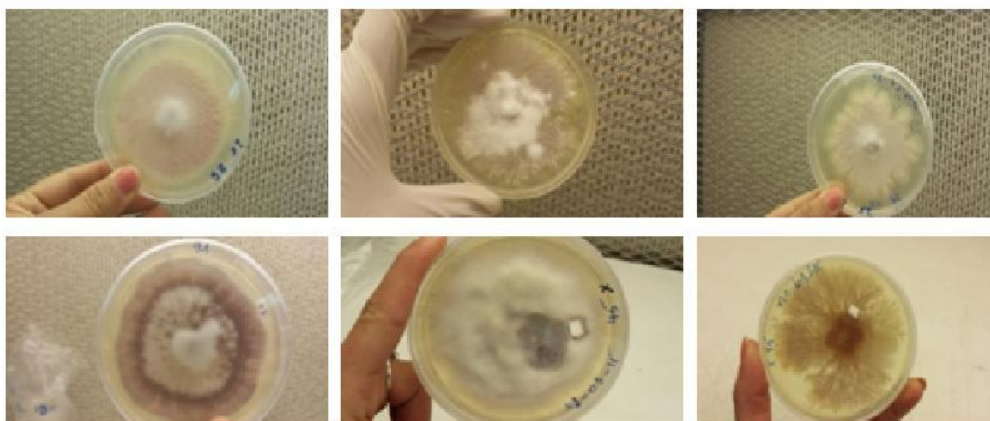
Après le rajeunissement des cultures par l'isolement de la monospore et plusieurs étapes de repiquage et de purification sur milieu PDA, l'identification du *Foa* s'est faite à l'aide de deux méthodes :

##### 1.2.1. Identification macroscopique :

Les 25 isolats ont montré une apparence et une morphologie variables. L'observation des isolats issus de la culture monospore, a montré que l'aspect du mycélium à l'œil nu est de 3 types morphologiques :

- Type cotonneux, mycélium aérien épais et dense
- Type duveteux, mycélium aérien peu épais et relativement peu dense.
- Type ras muqueux, pas de mycélium aérien et aspect muqueux.

Nous avons observé que chaque isolat cultivé sur milieu PDA pouvait apparaître avec différentes couleurs : blanchâtre à crème, jaune, brunâtre, rose, rouge, violet ou lilas.



**Figure 25 :** Variabilité des aspects morphologique observée chez nos isolats *Foa* sur milieu PDA

### 1.2.2. Identification microscopique

Les caractères microscopiques recherchés sont les différents types de spores et leurs aspects. L'observation microscopique, sous grossissement 40X, a révélé la présence d'un thalle cloisonné avec de courtes monophialides sur lesquelles se trouvent des microconidies, ainsi que la présence de macroconidies et de chlamydoconidies. Ces caractéristiques confirment l'isolement de l'espèce *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* à partir de rachis infectés.



**Figure 26 :** Observation microscopique de *Foa* sous grossissement X40

### 1.3. Test du pouvoir pathogène par l'inoculation des feuilles

Après le comptage par l'utilisation de la cellule de Malassez comme décrite précédemment, pour chaque isolat, nous avons préparé un inoculum à une concentration de  $10^6$  sp/ml (les solutions de spores très concentrées ont fait l'objet de dilutions à 1/10).

Les résultats obtenus (Tableau 9) ont montré et confirmé que toutes les souches reisolées à partir des rachis infectés sont agressives.

**Tableau 9** : Observation des feuilles détachées après 50 jours

<i>Souches</i>	<b>DN</b>				<b>TG</b>			
	<i>T</i>	<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>T</i>	<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>
<i>1</i>	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>5</i>	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>14</i>	-	++	++	++	-	+	+	+
<i>23</i>	-	++	+	+	-	+++	+	+
<i>24</i>	-	+++	+++	++	-	+	+	+
<i>27</i>	-	+	+	+	-	+++	+++	++
<i>28</i>	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>31</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>38</i>	-	+	+	+	-	++	+	+
<i>40</i>	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>43</i>	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>45</i>	-	+++	+++	++	-	+	+	+
<i>48</i>	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>50</i>	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>65</i>	-	+	+	+	-	++	++	++
<i>68</i>	-	+++	+++	+++	-	++	+	+
<i>70</i>	-	++	++	++	-	+	+	+
<i>75</i>	-	++	++	++	-	+	+	+
<i>76</i>	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>91</i>	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>93</i>	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>94</i>	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>96</i>	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>105</i>	-	++	+	+	-	+	+	+
<i>113</i>	-	+	+	+	-	++	+	+

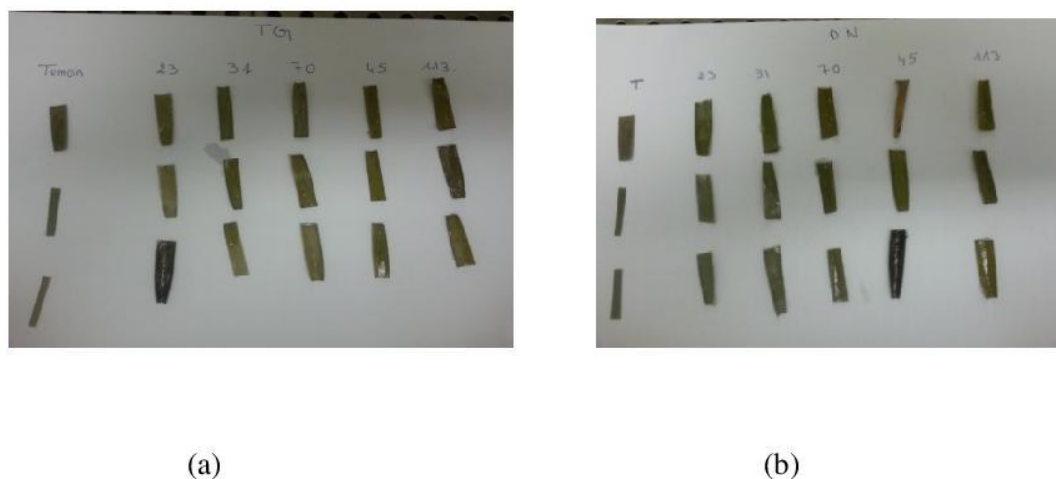
F feuilles.

- Pas de symptômes.

+ Apparition du Jaunissement

++ Jaunissement

+++ Flétrissement



**Figure 27** : Flétrissement des feuilles détachées

**(a)** : Flétrissement de la feuille pour la souche 23 chez le cultivar TG

**(b)** : Flétrissement de la feuille pour la souche 45 chez le cultivar DN

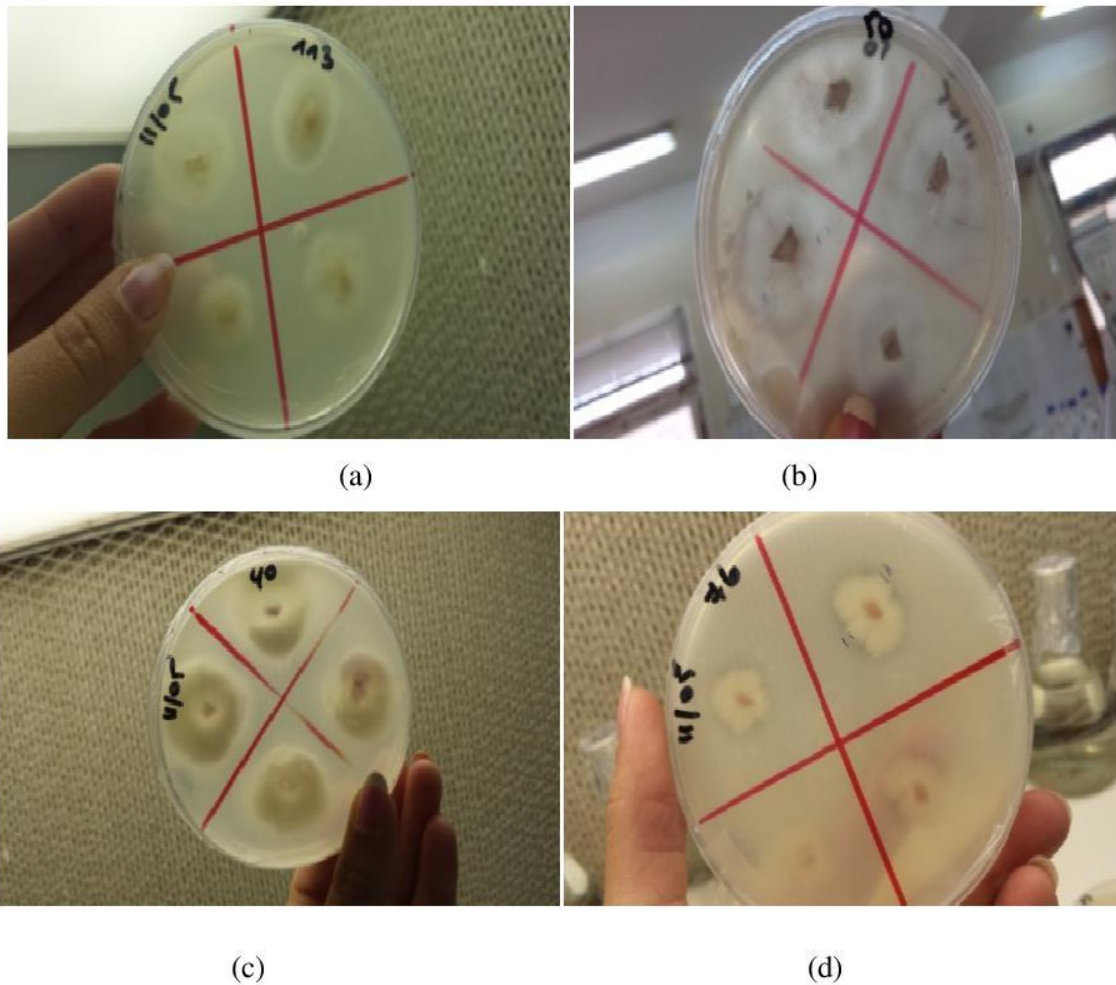
Selon une échelle que nous avons établie (- Pas de symptômes ; + Apparition du Jaunissement ; ++ Jaunissement ; +++ Flétrissement), les résultats du tableau 9 laissent apparaître l'existence de 3 observations principales des feuilles, selon leur comportement en présence de l'inoculum. Les effets varient en fonction de l'isolat et du temps d'inoculation. Les feuilles témoins ne présentent aucun symptôme visible pendant toute la durée de l'expérience.

La plupart des feuilles des deux cultivars Tagaza et Deglet Nour présentent un jaunissement. Par contre la manifestation des flétrissements s'observe chez quelques feuilles seulement de ces deux cultivars (Figure 27).

### 1.4. Solubilisation du phosphate

Cette étape consiste à la mise en évidence du degré de solubilisation du phosphate par le champignon qui s'illustre par l'apparition d'un halo transparent autour de chaque souche

La sélection s'est faite par la différence du niveau de l'activité de solubilisation du phosphate.



**Figure 28** : Halos de transparence autour des souches de *Foa*  
(Solubilisation du phosphate par *Foa*)

(a) : Halo autour de la souche 113

(b) : Halo autour de la souche 50

(c) : Halo autour de la souche 40

(d) : Halo autour de la souche 76

Nous avons observé que toutes les souches présentent un halo transparent autour du champignon révéillé après 72 h d'incubation à 28°C. Sur l'ensemble des isolats, plusieurs champignons montrent une zone importante du phosphate solubilisé. Une zone d'halo clair a été formée autour de la culture après 72 h d'incubation sur milieu Pikovskaya solide.

**Tableau 10 :** Indice de solubilisation du phosphate

Souches	Diamètre du halo (mm)	Diamètre des champignons(mm)	IS (Indice de Solubilisation)
1	1,5	1,8	83,33
5	2	1,5	133,33
14	1.5	1,3	115,38
23	2	2	100
24	1,1	1,7	64,70
27	2,2	1,7	129,41
28	1,7	1,4	121,42
31	1,7	1,6	106,25
38	1,2	0,3	400
40	1	1,8	55,55
43	2,5	1,8	138,88
45	2,5	2	125
48	2,5	1,8	138,88
50	3	2,5	120
65	2,2	1,6	135,5
68	2,1	1,8	116 ,66
70	1,4	2	70
75	1,8	1,4	128,57
76	1,8	1,3	138,46
91	1	1,2	83,33
93	2,8	1 ,7	164,70
94	2,3	2,1	109,52
96	2,5	2	125
105	2	1,8	111,11
113	2,2	2	110

La capacité de solubilisation des phosphates par nos souches est significative selon l'analyse de l'indice de solubilisation (Tableau 10).

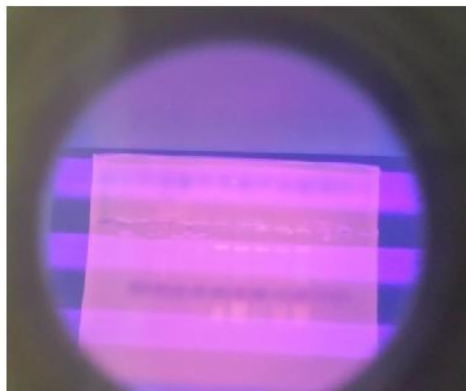
### 1.5. Extraction de l'ADN génomique

Après les différentes étapes d'extraction de l'ADN génomique des 25 isolats purifiés, nous avons procédé à la vérification de sa qualité sur gel d'agarose et par spectrophotométrie. L'ADN est par la suite quantifié avant son utilisation pour la caractérisation moléculaire.

#### 1.5.1. Contrôle et confirmation de la qualité d'ADN sur gel d'agarose

Pour confirmer les résultats de la spectrophotométrie, nous avons réalisé un gel d'agarose à 0.5%. Après une heure de migration à 110 volts, la visualisation du gel a révélé des bandes

intenses, ce qui confirme la quantité suffisante. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de smear et de bandes supplémentaires. Ces observations confirment également la bonne qualité de l'ADN extrait (Figure 29).



**Figure 29 :** Visualisation du gel sur la lampe UV Trans-illuminateur.

### **1.5.2. Qualité et quantification de l'ADN par spectrophotométrie (biophotomètre) :**

Après extraction de l'ADN de tous nos isolats, nous avons effectué des mesures d'absorbance de la longueur d'onde 260/280 nm pour vérifier la pureté d'ADN.

D'après le 11, l'ADN extrait est de bonne qualité. En effet, le rapport 260/280 nm est nettement inférieur à 1,8 pour tous les échantillons, ce qui signifie l'absence de protéines. Donc ils ne sont en aucun cas contaminés.

Les quantités d'ADN obtenues après extraction sont comprises entre 36,3 ng/ $\mu$ l et 1001,4 ng/ $\mu$ l. Notre extraction est de bonne qualité et nous avons une quantité suffisante d'ADN pour effectuer la PCR.

**Tableau 11** : Quantification d'ADN du rapport 260/280 au spectrophotomètre

Le code des souches	Quantité d'ADN ng/µl	Absorbance 260	Absorbance 280	Rapport 260/280
01	37.6	0.751	0.478	1.57
05 d	185	0.370	0.334	1.11
14	255,5	0,511	0,353	1,45
23	577,7	1.728	1.155	0.773
24	327.6	0.655	0546	1.20
27	39.2	0.078	0.064	1.22
28	41	0.820	0.488	1.68
31	425.3	0.851	0.760	0.524
38	366.5	0.733	0.448	1.63
40	460.1	0.920	0.556	1.62
43	782.9	1.566	1.150	1.36
45d	290,7	0,581	0,503	1,16
48d	418,7	0,837	0,745	1,12
50d	215.7	0,431	0,429	1.01
65d	234.8	0,470	0,285	1,22
68	460.9	0,922	0,578	1,60
70	1001,4	2,003	1,144	1,75
75	363	0,726	0,491	1,48
76	39.3	0.786	0.597	1.32
91d	135.7	0,271	0,239	1.14
93	471,1	0,942	0,625	1,51
94d	129,1	0,258	0,231	1,12
96	527.5	1,055	0,831	1,27
105	785	1,570	1,408	1,12
113d	428,6	0,857	0,639	1,34

d : dilution

### 1.6. La réaction de la PCR/ISSR

L'amplification de l'ADN de toutes les souches est réalisée sur gel d'acrylamide 0.1% et sur gel d'agarose à 0,5%.

La visualisation des bandes sur les deux gels n'a donné aucun résultat d'amplification d'ADN pour les deux marqueurs ISSR utilisés

Afin de confirmer ce résultat, une optimisation de la réaction PCR est réalisée. En effet, pour le même volume réactionnel, nous avons modifié la concentration en MgCl<sub>2</sub>, la quantité d'ADN, ainsi que la taq polymérase. Pour l'ensemble des paramètres vérifiés, nous avons obtenu le même résultat.

### 2. Discussion

L'étude morphologique de nos isolats a fait apparaître 3 morphotypes différents: l'aspect cotonneux, l'aspect duveteux et l'aspect ras muqueux. En effet, Bounaga (1970), Sedra et Djebri (1985) ont montré que le parasite *Foa* présente un aspect cultural, dans plus de 80% des cas, appelé forme sauvage ou forme typique, celle-ci est caractérisée par un mycélium fin frisé, ras, arbustif et d'aspect grasseux, de couleur rose saumon pâle et de croissance lente. A l'obscurité, sur des cultures vieilles, suivant le repiquage successif et/ou sur des supports synthétiques par des transferts de masse, *Foa* peut émettre un pigment violet foncé. La coloration devient pêche, rose, mauve ou violette, ou pourpre.

L'étude microscopique des souches nous a montré que le mycélium est cloisonné avec l'apparition des 3 sortes de spores: les microconidies, les macroconidies et les chlamydospores. Ces résultats sont concordants avec ceux auxquels ont abouti Armstrong et Armstrong (1981) et Toshiaki et Takashi (2004).

Cette diversité morphologique du genre *Fusarium* obtenue est identique à celle observée dans les travaux de Ouinten (1996) sur la même espèce, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, ainsi que ceux menés par Guessas (1993), Henni (1998) et Hamini (2002) sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Dans le but d'étudier le degré d'agressivité des 25 isolats de *Foa*, nous avons procédé à l'inoculation des feuilles détachées du palmier dattier par l'utilisation de suspension sporale propre à chaque souche. En parallèle, nous avons également testé l'aptitude de ces isolats à solubiliser le phosphate.

Nos résultats d'inoculation des feuilles détachées ont montré, qu'en fonction des isolats, l'agressivité des souches de *Foa* testées est différente. Notre choix de l'hôte s'est porté sur le cultivar Deglet Nour réputé très sensible (Péreau-Leroy, 1958; Louvet et Built, 1972; Saaïdi, 1979) ainsi que Tagaza. Le cultivar Takarboucht est présumé résistant car il forme des lots d'arbres apparemment sains en zone contaminée.

Les 25 souches utilisées n'interagissent pas de la même intensité avec l'hôte. En effet, l'intensité des symptômes observés n'est pas identique pour l'ensemble des souches et ce même en fonction du cultivar comme le montre la figure 27.

Après inoculation de feuilles détachées, nous avons observé que celles-ci apparaissent très sensibles, les résultats montrent que les effets varient en fonction du type du traitement (l'inoculum) et du temps d'inoculation. Les témoins ne présentent aucun symptôme visible pendant toute la durée de l'expérience.

Chez les deux cultivars, nous avons décelé un jaunissement des feuilles après une semaine de l'inoculation. Après 3 semaines, on observe un jaunissement flagrant de quelques feuilles. Les feuilles inoculées avec les souches 24, 45, 68, chez Deglet Nour, et 23,27 chez Tagaza (Tableau 9) ont montré un flétrissement significatif qui s'exprime après 50 jours, ceci s'explique par une agressivité élevée des souches 24, 45, 68 pour Deglet Nour, qui ne le sont pas pour Tagaza. Par contre, les souches 23 et 27 montrent une agressivité plus expressive chez Tagaza. Le flétrissement de ces feuilles a montré que les symptômes de la maladie sont caractérisés par une nécrose provoquant l'enroulement des feuilles puis un dessèchement total, ces résultats concordent avec ceux obtenus par Khelafi et *al.* (2006) et Sedra (2006).

Le phosphore (P) est un facteur limitant pour la croissance des plantes. Il n'est pas disponible sous forme soluble dans le sol, il est absorbé soit par le calcium, présent sur le complexe d'échange, soit par les formes libres de fer ou d'aluminium. Les microorganismes jouent un rôle important dans la solubilisation et le rendent disponible.

Plusieurs propriétés des microorganismes contribuent au pouvoir colonisateur au niveau de la rhizosphère. En effet, leur vitesse de croissance et leur pouvoir de solubilisation des minéraux sont des propriétés qui permettraient une bonne compétition, une durabilité et par conséquent une bonne prolifération, une colonisation et une infection de la plante dans le cas des microorganismes pathogènes (Lugtenberg et *al.*, 2001, Van Den Broek et *al.*, 2003).

La solubilisation de phosphate *in vitro* est exprimée par la formation d'un halo autour de la colonie, ceci est dû à la libération des métabolites dans le milieu tels que le bio-acide, (Sagoe et *al.*, 1998). Au niveau du sol, les microorganismes solubilisant les phosphates libèrent des molécules d'acides organiques de faible poids moléculaire et réduisent le pH de la rhizosphère (Goldstein, 1995; Deubel et *al.*, 2000). Nos résultats obtenus ont montré que toutes les 25 souches ont solubilisé le phosphate. Une zone d'halo transparente a été formée autour de chacune des souches après 72h d'incubation sur le milieu Pikovskaya solidifiée. La lecture des résultats est faite par la mesure du diamètre de solubilisation (halo) et le diamètre de la culture du champignon. L'indice de solubilisation est ensuite calculé. Ces résultats peuvent

être soutenus en les rapprochant des travaux réalisés de Whitelaw (2000), qui a conclu que les micro-organismes solubilisent le phosphate.

Parmi les 25 isolats testés, seule la souche 38 a solubilisé une quantité élevée de phosphate, le tableau 10 indique 400 pour l'indice de solubilisation calculé ce qui signifie que cette souche a la capacité de solubiliser le phosphate en quantité élevée et en un temps très court.

La capacité de solubilisation des phosphates par nos souches est significative selon l'analyse de l'indice de solubilisation. Le tableau 10 montre que les souches 5, 14, 23, 27, 28, 31, 43, 45, 48, 65, 68, 75, 76, 93, 94, 96, 105 et 113 présentent une solubilisation moyennement élevée, comparée à la souche 38, le taux est situé entre 100 et 164.

Par contre, l'indice de solubilisation est faible pour les souches suivantes 24, 40, 70, 91, les résultats sont moins concluants par rapport aux reste des souches, le taux est moins de 100 (Tableau 10). 23 7600

Enfin, notre démarche dans le cadre de cette étude est d'élucider le niveau d'agressivité des 25 isolats, à travers l'inoculation de feuilles de cultivars sensibles et leur aptitude à solubiliser les phosphates, et nous avons introduit un essai de caractérisation moléculaire à travers les marqueurs ISSR, afin de rechercher un éventuel polymorphisme. Les marqueurs ISSR sont très fiables pour l'étude de la diversité chez les eucaryotes. La technique ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) permet l'amplification des régions entre les microsattellites (Zietkiewicz et *al.*, 1994; Gupta et *al.*, 2002).

Les résultats ont montré que le protocole d'extraction utilisé est adopté en raison de la qualité d'ADN obtenue. Cependant, les deux amorces ISSR utilisées pour notre étude semblent être non fiables pour l'étude de la diversité dans le cas de notre pathogène. En effet, malgré l'essai d'optimisation de plusieurs paramètres, aucune amplification n'est obtenue. Il serait plus judicieux d'augmenter et de multiplier le nombre de marqueurs à tester mais également le nombre d'isolats.

**CONCLUSION  
ET  
PERSPECTIVES**

Le bayoud est un véritable fléau menaçant la phoéniciaculture. En effet, les meilleurs cultivars destinés à l'exportation sont les plus sensibles.

Parmi les moyens de lutte contre cette maladie, la sélection de cultivars résistants reste incontournable. Afin de bien évaluer la résistance, il est indispensable d'utiliser des souches agressives comme moyen de sélection.

Dans le présent travail, et dans le cadre du programme de recherche de la division de Biotechnologie et d'Amélioration des Plantes, notre objectif est la sélection de souches agressives de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* à travers :

- Inoculation de jeunes feuilles issus de deux cultivars sensible Deglet Nour et Tagaza et le cultivar résistant Takarboucht comme témoin positif.
- Solubilisation des phosphates sur milieu de culture PVK.

Enfin, nous avons abordé une caractérisation moléculaire des souches par l'utilisation des marqueurs ISSR.

Notre démarche a été abordée dans un premier temps par l'isolement et la purification des isolats par le rajeunissement des cultures par l'isolement de la monospore et plusieurs étapes de repiquage et de purification sur milieu PDA. Une étude morphologique (macro et microscopique) est par la suite réalisée.

Les résultats obtenus ont montré que l'aspect des souches issues de rachis est ras de couleur saumon clair. L'observation de l'aspect morphologique des 25 isolats qui ont fait l'objet de notre étude a montré une variabilité de couleur et d'aspect. En effet, la flore fusarienne est caractérisée par son polymorphisme morphologique.

L'agressivité des 25 isolats est variable. En effet, le test du pouvoir pathogène a montré qu'au bout de 2 mois d'expérimentation, les souches (24, 45, 68) ont induit un flétrissement accru des feuilles détachées du cultivar Deglet Nour. Pour le cultivar Tagaza, seule la souche 23 a induit le même flétrissement.

Toutefois, le test de solubilisation des phosphates n'a montré aucune différence entre les souches. L'indice de solubilisation est élevé (plus de 100) pour la plupart à l'exception de la souche 38 dont l'indice est de 400.

Enfin, la caractérisation moléculaire pour l'étude du polymorphisme des 25 souches à travers l'amplification de deux amorces ISSR ( $ACC$ )<sub>7</sub>  $CC$  et  $CCA(TGA)$ <sub>5</sub>, n'a révélé aucune

amplification. Le même résultat est observé après optimisation de la réaction PCR et deux répétitions.

Au terme de notre étude et vu les résultats obtenus, notre programme de recherche se poursuivra en tenant compte de :

- Répétition du test d'évaluation d'agressivité afin de confirmer le comportement des souches utilisées.
- Augmentation du nombre d'isolats.
- Poursuivre l'étude de l'activité physiologique des souches à savoir la solubilisation des phosphates et autres paramètres,
- Enfin, et concernant la diversité génétique à travers les marqueurs ISSR, il serait plus judicieux d'utiliser au moins 30 ISSR et probablement d'autres marqueurs.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

### A

- **Acourene, S., Buelguedj, M., Tama, M., Taleb, B. (2001).** Caractérisation, évaluation de la qualité de la datte et identification des cultivars rares de palmier dattier de la région des Ziban. *Revue Recherche Agronomique*, N°8, Ed. INRAA, p19-39.
- **Alabouvette, C. (1983).** La réceptivité des sols aux Fusarioses vasculaires, rôles de la compétition nutritive entre microorganismes. Thèse Doct.es-Sci. Nat. Univ. Nancy, 158 p.
- **Alves-santos, F. M., Martínez-Bermejo, D., Rodriguez-Molina, M. C., Diez, J. J. (2007).** Cultural characteristics, pathogenicity and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* Isolates from tobacco fields in Spain. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71, 26-32. In: Hamini, N. (2010). Diversité génétique des populations de *Fusarium* pathogène de la tomate sur le pourtour méditerranéen. Thèse de doctorat, Université d'Oran, Algérie.
- **Amir, H., Amir, A. (1988).** Les relations plante-sol-microflore dans le déterminisme du Bayoud. Table ronde sur le Bayoud, Alger, 19-20 Septembre.
- **Amir, H. (1991).** Interaction entre population du genre *Fusarium* dans les sols sahariens : Déterminisme de l'aptitude des souches non pathogènes à limiter l'expression de la fusariose vasculaire. Grade Docteurs Sciences Naturelles, USTHB.
- **Amir, H., Sabaou, N. (1983).** Le palmier dattier et la fusariose. XII. Antagénisme dans le sol de 2 actinomycètes vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, responsable du Bayoud. *Bull soc. Hist. Nat. Afr. Nord*, 13, 47-60.
- **Amir, H., Bennaceur, M., Laoufi, Z., Amir, A., Bounaga, N. (1985).** Le palmier dattier et la fusariose. XIII : Contribution à l'étude de l'écologie microbienne du sol de 2 palmeraies sahariennes atteintes de Bayoud. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*, 22, 313-330.
- **Amir, H. (1981).** Antagonisme de divers microorganismes vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, (Killian et Maire) Gordon, agent du Bayoud. Thèse Magister., Alger, USTHB.
- **Agrios, G. N. (2005).** Plant pathology. 5è ed. *Elsevier*. P. USQ. UK. P-952.

- **Armstrong, G. M., Armstrong, J. K. (1981).** Formae specialis and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: Nelson, P. E., Tousson, T. A et Cook, R. R. J (Eds.), *Fusarium : diseases, Biology and taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, University Park London, p. 391-399.

## B

- **Barrow, S. (1998).** A monograph of *L.* (Palmae: *Coryphoideae*). Kew Bulletin. 53: 513-575.
- **Ben Abdellah A. (1990).** La Phoeniciculture Options Méditerranéennes. Sér. A I n O II. Les systèmes agricoles oasisien.
- **Benkhalifa, A., Brac de la Perriere, R. A. (1991).** Progression de la fusariose de palmier dattier en Algérie. Sécheresse, 2 : 119-128.
- **Bessedik, F. (2006).** Contribution à l'étude des effets antagonistes de quelques bactéries de sols de deux parcelles indemne et bayoudée (région de Touat), sur la gravité de la fusariose vasculaire. Thèse de Magister, USTHB.
- **Bouho, D., Billotte, J. M. (1964).** Studies on the ecology of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* from the soil, Ann. Epiphyt., 15, 45-56.
- **Booth, C. (1971).** The genus *Fusarium*. Common wealth Mycolgical. Institute, Kew, Surrey, 237 p.
- **Booth, C. (1985).** The genus *Fusarium* Common wealth Mycolgical. Institute, Kew, 3ème Edition.
- **Bouguedoura, N. (1991).** Connaissance de la morphogénèse du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Etude in situ et in vitro du développement morphogénétique des appareils végétatif et reproducteur. Thèse de doctorat en sciences, U.T.H.B., Alger, 201 p.
- **Bounaga, N. (1985).** Contribution à l'étude de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Killian and Maire) Gordon, agent de la fusariose du palmier dattier. Thèse de doctorat d'état. Université des Sciences et Technologie Houari Boumediene, Alger, Algérie.
- **Bounaga, N. (1970).** Quelques aspects de la physiologie d'une souche de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent de la maladie du Bayoud. Bull. Soc. His. Nat. Alg. 60 :137-163. Abstr. Rev. Plant Pathol., 50,43.
- **Bounaga, N. (1991).** Le Palmier Dattier: Rappel biologique et problèmes physiologique. In: Riedcker, A., Dreyer E., Pafadnam C., Joly H., Bory, G., (Eds). Physiologie des

Arbre et Arbustes en Zone Arides et Semi-Arides, Groupe d'Etude de l'Arbre, John Libby Eurotext, Paris, France. Pp. 323-336.

- **Bounaga, N., Djerbi, M. (2009).** Pathologie du Palmier dattier, Unité de Recherche sur les Zones Arides. URZA (Institut National de la recherche agronomique, El Harrach, Algérie).
- **Brac de la Perriere, R. A., Benkhalifa, A. (1991).** Progression de la fusariose du palmier dattier en Algérie. Sécheresse, 2 : 119-128.
- **Bulletin du réseau Maghrébin de recherche sur la pheniculture et la protection du palmier dattier.** Octobre-décembre : 1(1).
- **Bulit, J., Bouhot, D., Louvet, J., Toutain, G. (1967).** Recherche sur les fusarioses. I. Travaux sur le bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier en Afrique du Nord. *Annales des Epiphyties* 18, 213-239.

## C

- **Chevalier, A. (1952).** Deux composées permettant de lutter contre l'imperata et empêchant la dégradation des sols tropicaux qu'il faudrait introduire rapidement en Afrique noire. *Rev. Intern. De bot. Appl. Et d'Agric. Trop.* 32: 494-497.
- **ChikhAissa, A, (1991).** Etude de l'efficacité de bromure de méthyle et de la chloropicrine sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Bull Rés Magh sur la phono et la flore du palm dattier.* 1 (3). 17-24.
- **Chowdhury, M. S. H., Halim M. A., Haque F., Koike M. (2008).** Traditional utilization of wild date palm (*Phoenix sylvestris*) in rural Bangladesh: an approach to sustainable biodiversity management. *Journal of forestry research* 19 (3): 245-251.

## D

- **Debourgogne, A. (2013).** Typage moléculaire du complexe d'espèces *Fusarium solani* et détermination de son mécanisme de résistance au voriconazole. Thèse de doctorat, Université de Lorraine, France.

- **Deubel, A., Gransee., Merbach, W. (2000).** Transformation of organic rhizodeposits by rhizoplane bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163 :387-392.
- **Djebri, M. (1982).** Bayoud disease in North Africa, distribution, diagnostic and control. *Date Palm Journal*, 1, 153-197.
- **Djerbi, M. (1983).** Diseases of the date palm *Phoenix dactylifera*. *FAO, Baghdad, Iraq*.
- **Djebri, M. (1990).** Méthodes d'identification du bayoud. *Fao/PNUD/RAB/88/024*.
- **Djerbi, M. (1988).** Les maladies du palmier dattier projet Régional de lutte contre le Bayoud *FAO RAB/84/018* 127p.
- **Djerbi, M. (1994).** Précis de phoéniculture. *FAO*, 192 p.
- **Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., Roncero, M. I. G. (2003).** *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus *Molecular. Plant Pathology*, 4, 315-325

## G

- **Goldstein, A. H. (1995).** Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram-negative bacteria. *Biol. Agri. Hort.* 12 :185-193.
- **Gomari, F.N. (2009).** Moyens de Luttés Chimique et biologique Contre le *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* Agent Causal du Bayoud Chez le Palmier Dattier *Phoenix dactylifera L.* Mémoire de magister. Université d'Oran, Algérie.
- **Gonzales-Péres, M., Caujapé-Castells, J., Sosa, P. (2004).** Allozyme variation and structure of the Canarian endemic palm tree *Phoenix canariensis (Arecaceae)*: implication for conservation. *Heredity* 93: 307-315.
- **Gordon, W. L. (1952).** The occurrence of *Fusarium* species in Canada. *Can. J. Bot.*, 30, 209-251.
- **Govaerts, R., Dransfield, J. (2005).** World checklist of palms. Royaume-Uni : Royal Botanic Gardens.
- **Gros-Balthazard, M. (2013).** Hybridization in the genus *Phoenix*: A review. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 25: 831-842.

- **Guessas, B.** (1993). Etude physiologique et lutte biologique de l'agent de la fusariose vasculaire de la tomate (*Lycopersicum esculentum*): *Fusarium oxysporum*. Thèse de magister. Université d'Oran. 84 p.
- **Guillemat, J., Montegut, J.** (1958). Troisième contribution à l'étude de la microflore fongique des sols cultivés. Ann. Epiphyte., 9, 27-54.
- **Guordon, W. L.** (1965). Pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. Can. J. Bot., 43, 1309- 1318.
- **Gupta, P.K., Varshney, R.K.** (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica 113: 163–185.

## H

- **Hamini, N.** (2009). Etude physiologique et évaluation de l'efficacité de certains fongicides vis-à-vis de *fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Thèse de magister Université d'Es Sénia. Oran.
- **Henderson, A.** (2009). Palms of southern Asia. Princeton: Princeton University press.
- **Henderson, S., billotte, N., Pintaud, J, C.** (2006). Genetic isolation of Cape Verde Island *Phoenix Atlantica* (*Arecaceae*) revealed by microsatellite markers. Conservation Genetics 7 (2): 213- 223.
- **Henni, J. E.** (1998). Morphologie, pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. These de Doctorat d'état. Université d'Oran. 171 p.

## I

- **Imi.** (1994). Distribution Maps of Plant Diseases No. 240(Eds. 3). CAB International, Wallingford, Royaume-Uni.

## J

- **Joffe, A. Z. (1974).** A modern system of *Fusarium* taxonomy. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 53, 201-228.

## K

- **Kester, D., Gradziel, T., Grassely, C. (1991).** Almonds (*Prunus*). *Acta Horticulturae (ISHS)*. 290: 701-760.
- **Khelafi, H., Abed. F., Yatta, D., Djellal, L., Yakhou, M. S., Sedra My, H. (2006).** Evaluation de Mutants de la variété Deglet nour de Palmier dattier pour la résistance au Bayoud. Conférence régionale « Mutagenèse Induite et Biotechnologies d'Appui pour la Protection du Palmier Dattier contre le Bayoud».
- **Khelafi, H. (2013).** Le palmier dattier et la maladie de Bayoud. INRAA- berraki.
- **Killian, C., Maire, R. (1930).** le bayoud, maladie du dattier. *Bull. Soc. Hit. Nat. Afr. Nord*, 21: 89-101.

## L

- **Lamprecht, S. C., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Shneider, D. J., Knox-Davies, P. S. (1986).** Incidence and toxigenicity seed borne *Fusarium* species from annual *Medicago* species in South Africa. *Phytopatology*, 76, 1040- 1042.
- **Link, J. H. F. (1809).** Observation in ordines plantarum naturalis. *Dissertatio I*,
- **Louvet, J. (1991).** Que devons nous faire pour lute contre le Bayoud. In: *Physiologie des Arbres et Arbustes en zones arides et semi-arides* (Eds. Riedaker, A., Dreyer, E., Pafadnam, C., Joly, H., Bory, G). Groupe d'étude de l'arbre, Jhon Libbey Eurotext, Paris, France, 337-346.
- **Louvet, J., Rouxel, F., Alabouvette, C. (1976).** Recherches sur la résistance des sols aux maladies. I -Mise en évidence de la nature microbiologique de résistance d'un sol au développement de la fusariose vasculaire du melon. *Ann. Phythopathol* 8(4), 425-436. Louvet, 1986.
- **Lugtenberg, B. J. J., Dekkers, L., Bloemberg, G. V. (2001).** Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. phytopathol.* 39: 461-490.

## M

- **Machardy, W. E., Beckman, C. H. (1981).** Vascular wilt Fusaria: infection pathogenesis. In: *Fusarium: diseases, biology Taxonomy* (Eds. Neslson, P. E., Tousson, T.A., Cook, R. J.), The Pennsylvania State University Press, University Park, 365-390.
- **Mair, R., Malençon, G. (1933).** Le Belâat, Nouvelle Maladie du Dattier dans le Sahara Algerien. *C Rend. Acad Sciences*, CXVI. 21: 1567-1569.
- **Malençon, G. (1934).** Nouvelles observation concernant letiologie du Bayoud, C, R. Acad. Sci. Paris, 19, 52-62.
- **Messaoudi, H., Messaoudi, L. (1989).** Etude phytopathologique, morphologique et physiologique de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Mémoire pour l'obtention du D.E.S.
- **Messiaen, C. M., Lafon, R. (1970).** Les maladies des plantes maraichères. (Eds.) INRA. Paris. 431 p.
- **Messiaen, C, M., Cassini, R. (1968).** Recherches sur la fusariose. IV. La systématique des *Fusarium*. Ann, Epiphyt., 19, 387-454.
- **Mc Mullen, M. P., Stack, R. W. (1983).** Effect of isolation techniques and media on the differential isolation of *Fusarium* species. *Phytopatology*, 73, 458-462.
- **Munier, P. (1973).** Le palmier dattier. Paris : Maisoneuve et Larose, 15-72.

## N

- **Nelson, P.E., Tousson, T. A., Cook, R. K. J. (1981).** *Fusarium*. Diseases, Biology and Taxonomy. Penn. Stat. Univ. Press., 457 p.
- **Nelson, P. E., Tousson, T. A., Marassas, W. F. (1983).** *Fusarium* species. An illustrated manuel for identification. Penn. Stat. Univer. Press. 193p.
- **Newton, C., Gros-Balthazard M., Ivorra, S., Paradis, L., Pintaud J.-C., Terral J.-F. (2013).** *Phoenix dactylifera* and *P. sylvestris* in Northwestern India: A glimpse into their complex relationships. *Palms* 57 : 37–50.
- **Ouinten, M. (1996).** Diversité et structure génétique des populations algériennes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent de la fusariose vasculaire (bayoud) du palmier dattier. Thèse de Doctorat. Science et Technique du Languedoc. Université de Montpellier II.

## O

- **Ozbay, N., Newman, S. E. (2004).** *Fusarium* crown and root rot of tomato and control methods. *J. Plant. Pathol.*, 3, 9-18.

## P

- **Péreau-Leroy, P., (1958).** Le palmier dattier au maroc. Min. Agric. Maroc. Service. Rech.Agron.et inst francais Rech. Fruit outre Mer, (I.F.A.C), 142 p.

## R

- **Rahmania, F. (1988).** Histopathologie: relation hôte-parasite. **Table ronde sur le Bayoud**, Algerie, alger, 19-20 septembre. *INRAA-Beraki*
- **Raillo, A. J. (1950).** Fungi of the genus *Fusarium*. Government Publishers of Agricultural Literature, Moscow.
- **Rebell, G. (1981).** *Fusarium* infection in human and veterinary medicine. In: *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*, (Eds) Nelson, P.E., Tousson, T.A., Cook, R. J. The Penn. State Univ. Press. Univ. Park and London.

## S

- **Saaidi, M. (1979).** Contribution à la lutte contre le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier. Thèse d'université. Dijon-France. 140pp.
- **Sagoe, C. I., Ando, T., Kouno, K., Nagaoka, T. (1998).** Relative importance of protons and solution calcium concentration in phosphate rock dissolution by organic acids. *Soil Science and Plant Nutrition*, 44, 617-625.
- **Sedra My, H. (1999).** Protection et importance du bayoud en Mauritanie et actions urgentes a prendre pour lutter contre la maladie. Rapport de mission de consultation FAO effectuée du 19/10/99 au 18/11/1999 en République Islamique de Mauritanie et

proposition de projet de lutte contre le bayoud dans ce pays. Mission financée par le projet 'Développement des Oasis, phase II, UFT/MAU/020/MAU'.

- **Sedra My, H. (2001) b.** la maladie du Bayoud du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*), extension, dégâts, diagnostic et recommandation pratique de prévention pour l'extension et le développement de la maladie. Brochure de vulgarisation.(Réseau Arabe de Recherche et de développement du Palmier-ACSAD-Syrie), (en arabe),24 p.
- **Sedra My. H. (2003) a.** Le bayoud du palmier dattier en Afrique du nord, FAO, RNE/SNEA-Tunis. Edition FAO sur la protection des plantes. Imprimerie Signes, Tunis, Tunisie, 125p.
- **Sedra My. H. (2006).** La maladie du Bayoud sur le palmier dattier, apparition; impact ; propagation et condition méthodes de diagnostic et de lutte; recherche et perspectives. En arabe l'association arabe sur le développement agricole. AOAD. p-77.
- **Sedra My. H. (2003) c.** Culture du Palmier Dattier et caractérisation et classement des principales variétés mauritaniennes. Edition OADA, 261 pp.
- **Sedra, M. H., Djerbi, M. (1985).** Mise au point d'une méthode identification in vitro du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du bayoud. **Annal de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunis.** 2 (58): 1-12.
- **Snyder, W. C., Hanssen, H. N. (1940).** The species concept in *Fusarium*. *Amer. J. Bot.*, 27: 64-67.
- **Summurell, b. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., Burgess, L. W. (Eds). (2001).** *Fusarium* : Paul, E. Nelson Memorial Symposium. American Phytopathological society Press, St. Paul, Minnesota. 408 pp.

## T

- **Tantaoui, A. (1993).** Identification rapide et première évaluation de la variabilité du *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis* par la compatibilité végétative. *Alawamia*, 82 : 25-37.
- **Toshiaki, O., et takashi, T. (2004).** FoSSTUA, Encoding a Basic Helix-Loop-Helix Protei. Differentially Regulates Development of three Kinds of Asexual Spores, Macroconidia, Microconidia and Chlamydo spores, in the Fungal Plant Pathogen *Fusarium oxysporum*. University, Chikusa. Japan.

- **Tirichine, M. (2002).** La protection du patrimoine phoenicicole: Organisation de la quarantaine végétale, contrôle et réglementation Cours de formation des cadres mauritaniens.
- **Tirichine, M. (2006).** Le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier Communication présentée lors du stage sur l'habilitation des laboratoires régionaux aux diagnostics réglementaires des organisations. *INPV*. Février 17-20.
- **Toutain, G. (1965).** Note sur l'épidémiologie du bayoudh en Afrique du Nord. *El awamia*, 15, 37-45.
- **Taveaud, M., Zanetto, A., David, J. L., Laigret, F., Dirlewanger, E. (2004).** Genetic relationships between diploid and allotetraploid cherry species (*Prunus Avium*, *Prunus gondouinii* and *Prunus cerasus*). *Heredity* 93: 631-638.

## V

- **Van den Broek, D., Chin-A-Woeng, T. F. C., Eijkemans, K., Mulders, I. H., Bloemberg, G. V., Lugtemberg, B. J. J. (2003).** Biocontrol traits of *pseudomonas* spp. Are regulated by phase variation. *Mol Plant Microbe Interact* 16, 1003-600.

## W

- **Waltz, S. S., Johnes, J. P. (1981).** Nutritional requirements of *Fusarium oxysporum*. Basis for a disease control system.
- **Wollenweber, H. W., Reinking, O.A. (1935).** Die *Fusarium*, ihre Beschreibung. Schadwirkung and Bekämpfung. Berlin. Paul Parey., 355 p.

## Y

- **Yakoub-Bougdal, S. (1987).** Etude des inductions morphogénétiques chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) Cv Deglet Nour en culture *in vitro*. Analyses cytophotométrique et autoradiographique. Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie curie Paris sous la direction M<sup>me</sup> Duteind. VI. Pp 100.

- **Yakoub-Bougdal, S. (2005).** Morphogenèse *in vitro* du palmier dattier (*Phoenix dactilyfera L.*) et l'olivier (*Olea europea L.*) var Chemlal. Thèse de doctorat d'état et sciences Biologie végétale université de Tizi Ouzou. Mouloud Mammeri, p 190. Dirigée par le Pr. F.Bounaly, Docteur en pharmacie (Faculte de pharmacie de Chatenay Malabry, Paris XI).

## **Z**

- **Zaïd, A. (2002).** Dat Palm Cultivation. FAO Plant and Protection Paper. 156. Rev. 1. ISSN
- **Zietkiewicz, E., Rafalski, A. Labuda, D. (1994).** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176–183. 0259- 2517, ISBN 92-5-104863-0.

### **Autre références**

- **F.A.O. (2012)** Organisation des Nations Unies pour l'Amélioration et l'Agriculture. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. consulter le: 13.10.2015.
- **Bulletin du réseau Maghrébin de recherche sur la pheniculture et la protection du palmier dattier.** Octobre-décembre : 1(1).

# **ANNEXES**

## ANNEXES

### Annexe 1



**Figure 1 :** Etuve



**Figure 2 :** compteur de cellules (Spores)



**Figure 3 :** Hotte à UV

## Annexe 2



**Figure 4 : Autoclave**



**Figure 5 : Lampe UV trans-illuminateur**



**Figure 6 : Cellule de Malassez**



**Figure 7 : Stérilisateur à billes**

## Annexe 3



**Figure 8 :** Microscope



**Figure 9 :** Stéréo-microscope



**Figure 10 :** PCR



**Figure 11 :** Centrifugeuse

## **Annexe 4**

### **Préparation de l'alcool Ethanol 70%, 80%, 95% à partir de 96% :**

#### **1. Préparation de l'alcool 70 %**

- 40,85ml H<sub>2</sub>O distillé stérile
- 100ml Alcool 96%

#### **2. Préparation de l'alcool 80 %**

- 22,45ml H<sub>2</sub>O distillé stérile
- 100ml Alcool 96%

#### **3. Préparation de l'alcool 95 %**

- 1,25ml H<sub>2</sub>O distillé stérile
- 100ml Alcool 96%

#### **4. Préparation l'hypochlorite de calcium 12° a partir de 13°**

- 740ml H<sub>2</sub>O distillé
- 260ml l'hypochlorite de calcium 13°

#### **5. Préparation du TBE 5 X**

Pour 2L du TBE on a besoin de:

- 80ml EDTA
- 56g Acide Borique
- Eau distillé 2l
- Ajustement du pH (pH=8)

#### **8. Préparation de la dilution du TBE 0.5 X à partir de 5 X**

- 900ml H<sub>2</sub>O distillé stérile
- 100ml

## **Annexe 5**

### **6. Préparation des gels**

#### **Milieu gélosé**

- 2000ml H<sub>2</sub>O distillé stérile
- 30g Agar

#### **Milieu PDA**

- 1000ml H<sub>2</sub>O distillé stérile
- 39g de poudre de pomme de terre.
- 20ml streptomycine

#### **Milieu PVK (Pikovskaya, 1948) pour 1000ml H<sub>2</sub>O distillé stérile**

#### **Le pH=6**

- 0.5g (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 0.5g Extrait de levure
- 5g Phosphate bicalcique
- 0.2g KCl
- 0.1g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
- 10g Glucose
- 15g Agar
- trace MnSO<sub>4</sub>
- trace FeSO<sub>4</sub>
- 

#### **Préparation du gel d'agarose 0.5 %**

- 300ml TBE 0,5%
- 4,5g Agarose
- 14 µl BET

#### **Préparation du gel d'acrylamide**

- 112,5ml H<sub>2</sub>O
- 15ml TBE

- 22,5ml Acrylamide
- 420  $\mu$ l APS
- 112,5  $\mu$ l TEMED

### **Préparation de la streptomycine**

- 500mg de streptomycine
- 100ml H<sub>2</sub>O

## Résumé

L'évaluation du degré d'agressivité de 25 souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* par l'observation de symptômes induits sur des feuilles inoculées de deux cultivars sensible (Deglet Nour et Tagaza) et un cultivar résistant (Takarboucht), a montré que seules 3 souches (24, 45, 68) ont induits un flétrissement accru comparé aux symptômes induits par le reste des souches testées. L'ensemble des souches a montré une bonne aptitude de solubilisation des phosphates *in vitro*. La souche 38 semble être la plus active étant donné que son indice de solubilisation est de 400.

Les deux marqueurs ISSR testés  $(ACC)_6 CC$  et  $CCA (TGA)_5$  pour l'étude de la diversité, n'ont montré aucune amplification et ce pour l'ensemble des 25 souches.

**Mots clés :** *Palmier dattier (Phoenix dactylifera L.), Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, flétrissement agressivité, solubilisation, ISSR.

## Abstract

The evaluation of the aggressiveness level of 25 strains of *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, by observing induced symptoms on the inoculated leaves of two sensitive cultivars (Deglet Noor and Tagaza) and a resistant cultivar (Takarboucht), showed that only 3 strains (24, 45, 68) have induced an increased wilting symptoms compared to the remains strains tested. The *in vitro* phosphate solubilization showed that all strains have a good ability. However the strain (38) appears to be more active as its solubilization index is 400.

The diversity study by using two ISSR markers  $(ACC)_6 CC$  et  $CCA (TGA)_5$  showed no amplification for all 25 strains.

**Keywords:** *Date palm (Phoenix dactylifera L.), Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, aggressiveness, phosphates solubilization, ISSR.