

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE - EL HARRACH - ALGER

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences Agronomiques

Spécialité : Phytopathologie

Option : Biotechnologie appliquée à la protection des plantes

***Caractérisation morphologique et
génétique de quelques isolats de *Fusarium
oxysporum f. sp. albedinis* (Killian & Maire)
W. L. Gordon, agent causal de la fusariose
du palmier dattier.***

Par CHIHAT SALIHA

Directeur de thèse M^r KEDAD A. Chargé de cours, ENSA Alger

Année Universitaire : 2011 – 2012

Soutenue le 01 Décembre 2011 devant le Jury : Président M^r KHELIFI L. professeur, ENSA Alger

Examineurs M^r BOUZNAD Z. Professeur, ENSA Alger M^r GUEZLANE A. Maitre de conférences,

ENSA Alger M^{me} LOUANCHI M. Maitre de conférences, ENSA Alger

Table des matières

Résumé ..	5
Abstract ..	6
ص-خلجلا ..	7
1.introduction ..	8
2. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES ..	10
2.1. Origine et aire de répartition géographique du palmier dattier ..	10
2.1.1. Origine géographique du palmier dattier ..	10
2.1.2. Aire géographique de répartition de la culture du palmier dattier ..	10
2.2. Importance économique du palmier dattier dans le monde et en Algérie ..	11
2.2.1. Evolution de la production mondiale de dattes ..	11
2.2.2. Evolution de la production de dattes en Algérie ..	11
2.3. Quelques données botaniques et écologiques du palmier dattier ..	13
2.3.1. Systématique du palmier dattier ..	13
2.3.2. Description botanique du palmier dattier ..	13
2.3.3. Quelques données écologiques du palmier dattier ..	15
2.4. Contraintes de la culture du palmier dattier ..	15
2.5. La Fusariose vasculaire du palmier dattier ou “Bayoud” ..	16
2.5.1. Origine et distribution géographique du “bayoud” ..	17
2.5.2. Symptomatologie du “bayoud” ..	18
2.5.3. L’agent causal de la fusariose du palmier dattier” ..	18
2.5.4. Cycle biologique de la fusariose vasculaire du palmier dattier ..	20
2.6. CARACTERISATION DE L’AGENT CAUSAL DU BAYOUD ..	22
2.6.1. Caractérisation culturelle et morphologique ..	22
2.6.2. Caractérisation de <i>F.o.a</i> par la compatibilité végétative ..	23
2.6.3. Caractérisation du <i>F.o.a.</i> par les marqueurs moléculaires ..	24
3. MATERIELS ET METHODES ..	26
3.1. MATERIELS : ..	26
3.1.1. Isolats fongiques ..	26
3.1.2. Milieux de culture ..	26
3.1.3. Amorces oligonucléotidiques ..	26
3.2. METHODES ..	26
3.2.1. Isolements des souches de <i>F.o.a.</i> ..	26
3.2.2. Purification et conservation des souches ..	28
3.2.3. Caractérisation culturelle et morphologique des isolats de <i>F.o.a.</i> ..	28
3.2.4. Caractérisation des isolats de <i>F.o.a.</i> par la technique de la compatibilité végétative ..	29
3.2.5. Caractérisation génétique par la RAPD ..	31
4. RESULTATS ET DISCUSSION ..	33
4.1. Caractérisation morphologique des isolats de <i>F.o.a.</i> et de <i>F.o.</i> ..	33
4.1.1. Caractères culturels. ..	33
4.1.2. Croissance mycélienne radiale sur différent milieux de culture ..	35

4.1.3. Croissance mycélienne radiale sous différentes températures . . .	37
4.2. CARACTERISATION DES ISOLATS DE <i>F.O.A.</i> ET DE <i>F.O.</i> PAR LE TEST DE compatibilité végétative . . .	38
4.2.1. Isolement des mutants "nit" . . .	40
4.2.2. Caractérisation des mutants "nit" . . .	40
4.2.3. Confrontation des mutants . . .	40
4.3. Caractérisation genetique DES ISOLATS DE <i>F.O.A.</i> PAR LA RAPD . . .	43
4.3.1. Etude du polymorphisme de l'ADN des isolats de <i>F.o.a.</i> par la RAPD . . .	43
5. conclusion . . .	49
6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES . . .	51
ANNEXES . . .	57

Résumé

Le bayoud, flétrissement vasculaire du palmier dattier causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Killian. & Maire) W.L. Gordon, (*F.o.a.*) constitue l'une des maladies la plus destructive et la plus menaçante au Maroc et dans le Sud Ouest Algérien.

Dans ce présent travail, nous avons essayé de caractériser morphologiquement (aspect du mycélium, couleur des colonies, croissance mycélienne sur trois milieux de culture et également à différentes températures sur milieu PDA) et génétiquement (compatibilité végétative et RAPD) 44 isolats dont 40 de *F.o.a.* et 4 de *F.o.* provenant de palmeraies des wilayates d'Adrar et de Ghardia.

La caractérisation morphologiques a montré que les isolats de *F.o.a* sont peut diversifiés

La caractérisation des isolats de *F.o.a.* et de *f.o.* par la technique de la de compatibilité végétative a montré que les 40 isolats isolés à partir du rachis appartiennent au même groupe de compatibilité végétative. Par contre, aucun des isolats isolés à partir du sol appartient à ce même groupe.

La caractérisation des isolats de *F.o.a* par la technique RAPD, a montré un faible polymorphisme entre quelques isolats de la wilayat d'Adrar

Mots clés : palmier dattier, Bayoud, flétrissement vasculaire, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, compatibilité végétative, polymorphisme, RAPD.

Abstract

Bayoud, vascular wilt of date palme, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Killian. & Maire) W.L. Gordon (*F.o.a*) constitutes one of the most destructive and threatening diseases in Morocco and the Southern west of Algeria.

In this work we tried to characterize morphologicly (aspect and colour of mycelium, mycelial growth on three medium of culture and equally in different temperatures on PDA medium) and genetically (vegetative compatibility and RAPD) 44 isolates whom 40 of *F.o.a* and 4 of *F.o.* from palm groves of Adrar and Ghardaïa

The morphological characterization has detected that the *F.o.a* isolates are few diversified

The characterization of *F.o.a* and *F.o* by vegetative compatibility technic has shown that the 40 isolates isolated from rachis are gathered into one group of vegetative compatibility, however any isolates isolated from soil belongs to this group.

The characterization of *F.o.a* isolates by RAPD technic has shown a slight polymorphism between some isolates of Adrar.

Key words : palm date, bayoud, vascular wilt, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* vegetative compatibility, polymorphism, RAPD.

ص-خلجل1

البيوض، الذبول الوعائي لنخلة التمر المسبب من طرف *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* (F.o.a) يعتبر من بين الأمراض الأكثر إتلافا و تهديدا في منطقتي المغرب و الجنوب الغربي للجزائر

حاولنا في هذا العمل أن نحدد الخصائص التشكلية لهذا المرض (مظهر متبجعة الفطر، لون المستحمرات، النمو المشيجي الفطري في ثلاثة أوساط غذائية و بالموازاة في عدة درجات حرارة في وسط PDA) و وراثيا (التوافق النباتي و RAPD) 44 عينة من بينها 40 (F.o.a) و الـ 4 الأخرى من (F.o) أصلها من واحات ولايتي أدرار و غرداية

تحديد الخصائص التشكلية بين أن عينات الـ (F.o.a) صئيلة التنوع

تحديد خصائص عينات الـ (F.o.a) و الـ (F.o) بتقنية التوافق النباتي بين أن 40 عينة مأخوذة من السعف تنتمي إلى نفس مجموعة التوافق النباتي، خلافا على ذلك أي من هذه العينات و المأخوذة من التربة تنتمي إلى نفس المجموعة

تحديد خصائص عينات الـ (F.o.a) بتقنية RAPD بين تنوع ضئيل بين بعض عينات ولاية أدرار

الكلمات الرئيسية : نخيل التمر- بيوض - ذبول وعائي - توافق نباتي - تنوع - RAPD

1. introduction

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est l'une des plantes la plus anciennement cultivée et la plus adaptée aux zones arides et semi-arides du globe. Cet arbre constitue le pivot central autour duquel s'articule la vie dans les oasis sahariennes où il crée un milieu favorable aux activités des habitants des régions désertiques et de leurs cheptels. Ecologiquement, il joue un rôle important dans la protection des oasis contre les influences désertiques comme, par exemple, le rayonnement solaire intense, la sécheresse de l'air, les vents chauds, ... etc. En outre, il crée un microclimat favorable au développement de nombreuses spéculations agricoles sous jacentes telles que les cultures céréalières, maraichères, fourragères et arboricoles. Sur le plan économique, l'exploitation du palmier dattier constitue une entrée de devises appréciable pour les pays producteurs et également une source de revenus non négligeables pour les agriculteurs et les habitants des oasis. Par ailleurs, les dattes constituent la base de l'alimentation de ces derniers.

La culture du palmier dattier est cependant menacée par une maladie destructive appelée communément "bayoud" dont l'agent causal est un champignon tellurique : *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Killian & Maire) W. L. Gordon (= *F.o.a.*). Depuis son apparition au début du XIX^{ème} siècle, cette maladie a causé des pertes considérables dans les oasis du sud marocain et du sud ouest algérien (DJERBI, 1988 ; SEDRA, 2003) où elle a détruit environ 20 millions d'arbres (FREEMAN et MAYMON, 2000). Il est à remarquer que tous les cultivars Nord-Africains de haute qualité dattière comme, par exemple, Mejhoul, Bou Feggous, Deglet Nour, ... etc. sont sensibles à cette maladie. C'est ainsi qu'au Maroc, la variété Mejhoul a subi des pertes considérables à cause de sa grande sensibilité à l'égard du "bayoud". En Algérie, la variété Deglet Nour qui est destinée à l'exportation et qui est classée comme l'un des meilleurs cultivars commerciaux à l'échelle mondiale est actuellement menacée par le "bayoud". Les riches palmeraies de l'est algérien où la variété Deglet Nour occupe 45% du verger phoenicicole (ABED et al., 2006) sont actuellement menacées par le "bayoud".

Les stratégies de lutte utilisées contre les maladies vasculaires causées par les pathogènes telluriques sont très limitées ou quasi inexistantes (EL HASSNI et al., 2007). En ce qui concerne la lutte contre le "bayoud", plusieurs stratégies ont été déployées. La lutte chimique par éradication du *F.o.a.* à l'aide de fumigants (bromure de méthyle et chloropicrine) est efficace, cependant cette méthode ne peut être envisagée à cause du coût élevé des traitements, du risque de pollution de l'environnement oasien et de la difficulté de détruire la totalité du parasite qui peut vivre à une profondeur d'environ 1 mètre dans le sol (SEDRA, 2003). L'utilisation de sols suppressifs ou

résistants et de micro-organismes antagonistes au *F.o.a.* a été explorée par différents auteurs (Amir et al., 1985, Amir et Amir, 1988 ; SEDRA et EL IDRISSE, 1995 ; BESSEDIK et al., 2006 ; SEDRA, 2003 ; EL HASSNI et al., 2007 ; KADRI, 2008) mais aucune application de ces antagonistes en milieu réel n'a été réalisée. Le développement de cultivars résistants au *F.o.a.* apparaît comme la mesure de lutte la plus appropriée et la plus économique (DJERBI, 1991 ; LOUVET, 1991). La sélection de palmiers de haute qualité dattière et résistants au "bayoud" se fera parmi les populations naturelles ou parmi celles issues de

croisements dirigés (Saaidi *et al.*, 1981 ; DJERBI, 1991). La résistance des cultivars doit tenir compte de la diversité génétique potentielle de *F.o.a.* (FERNANDEZ *et al.*, 1995).

L'identification de *F.o.a.* par les caractéristiques culturaux et morphologiques est apparemment aisée (DJERBI *et al.*, 1985 ; SEDRA et DJERBI, 1985). Cependant, de grandes variations sont souvent observées dans l'agressivité des isolats de *F.o.a.* provenant de rachis et ceux de *F. oxysporum* isolés à partir de sol de palmeraies infectées ou de porteurs sains (henné, luzerne, trèfle, ...etc.). Le *F.o.a.* peut être identifier par le test de compatibilité végétative (DJERBI 1990 a et b, DJERBI *et al.*, 1990 ; TANTAOUI et BOISSON, 1991 ; OUINTEN, 1991) qui fournit également un moyen pour étudier la diversité génétique des populations de *F.o.a.* . Certains marqueurs moléculaires comme la RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") et la RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") ont été utilisés pour l'étude de la diversité génétique des populations de *F.o.a.* (FERNANDEZ *et al.*, 1995 ; OUINTEN, 1996 ; TANTAOUI *et al.* 1996 ; FERNANDEZ *et al.*, 1997 ; SEDRA, 2003), d'autres comme la PCR ("Polymerase Chain Reaction") ont été employés afin d'identifier avec exactitude ce pathogène (FERNANDEZ *et al.*, 1998).

Le présent travail a porté, dans une première étape, sur la caractérisation par des méthodes classiques d'une collection d'une quarantaine d'isolats de *F.o.a.* provenant de deux wilayates du Sud Algérien : Adrar et Ghardaïa. Cette caractérisation a porté principalement sur les aspects culturaux et morphologiques des isolats de *F.o.a.* comme la forme et la couleur du mycélium ainsi que la croissance radiale des colonies. Afin de compléter cette caractérisation morphologique et culturelle, nous avons réalisé, dans une seconde étape, le test de compatibilité végétative afin d'identifier et d'étudier la diversité génétique des isolats de *F.o.a.* Dans une troisième étape, nous avons essayé d'évaluer la diversité génétique des isolats de *F.o.a.* par la RAPD.

2. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une plante dioïque. C'est une monocotylédone pérenne qui a une grande importance socio-économique en Afrique du Nord et au Moyen Orient où on dénombre 62 millions d'arbres couvrant approximativement une superficie d'un million d'hectares (Statistiques FAO, 2004). Cet arbre joue un rôle écologique important dans les régions désertiques puisqu'il contribue à la création d'un microclimat favorable au développement de nombreuses cultures sous-jacentes. Il est non seulement cultivé pour la production de dattes qui constituent l'alimentation de base des populations humaines et animales des régions désertiques, mais également pour ses différents usages domestiques (farine de dattes, articles artisanaux, bois de charpente, ... etc.).

2.1. Origine et aire de répartition géographique du palmier dattier

Le palmier dattier est probablement l'un des plus vieux arbres fruitiers dont la culture remonte à 3700 av. J.-C (Munier, 1973) dans la zone comprise entre les vallées de l'Euphrate et du Nil. A partir de là, il s'est étendu à d'autres régions du globe où les conditions climatiques sont favorables à son développement.

2.1.1. Origine géographique du palmier dattier

Le centre d'origine du palmier dattier n'est pas connu avec exactitude. Cependant, on pense que cette espèce a pris naissance soit à Babel en Irak, soit à Daraan ou Hofuf en Arabie Saoudite, soit dans une île du Golfe arabe au large de Bahreïn (EL HADRAMI et EL HADRAMI, 2009). Sa culture a dû être pratiquée en basse Mésopotamie (sud de l'Irak actuel) vers 2500 av. J.-C (Munier, 1973). Elle a progressé, par la suite vers le nord de la Mésopotamie à travers les vallées du Tigre et de l'Euphrate pour gagner la région côtière du Plateau iranien et atteindre finalement la vallée de l'Indus (Pakistan actuel) (Munier, 1973 ; ZAID et de WET, 2002 ; EL HADRAMI et EL HADRAMI, 2009). Elle s'est étendue ensuite à l'Egypte, puis à la Libye et le Fezzan d'où elle rayonna, d'une part, vers le Maghreb [Tunisie (Djerid), Algérie (Souf, Oued Rhir, Tidikelt et Saoura), Maroc (Tafilalet et vallée du Draa) et Mauritanie (Adrar mauritanien)], et d'autre part, vers le sud [Mali (Tassili N'Ajjer, Hoggar et Adrar des Iforas), Niger (Djado-Kaouar) et Tchad (Borkou-Tibesti)] (Munier, 1973 ; ZAID et de WET, 2002).

2.1.2. Aire géographique de répartition de la culture du palmier dattier

L'aire de culture du palmier dattier s'étend de la vallée de l'Indus à l'est jusqu'à la côte atlantique de l'Afrique au nord-ouest. Cette aire est caractérisée par des températures élevées (35°C) favorables à la ger-

grains de pollen et par une très basse humidité relative de l'air qui est nécessaire à la formation et à la maturation des dattes. Le palmier dattier croit dans presque toutes les zones arides situées entre le 9^{ème} et le 39^{ème} degré de latitude Nord qui sont représentées par le Sahara et la frange sud du Proche Orient (Péninsule arabique, sud de l'Irak, Jordanie) (EL HADRAMI et EL HADRAMI, 2009). Cependant, la zone la plus favorable à la culture du palmier dattier se localise entre le 24^{ème} et le 34^{ème} degré de latitude Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Lybie, Egypte, Iraq, Arabie Saoudite ... etc.) (TRIKI et al. 2003). Cet arbre est également cultivé dans certains pays méditerranéens d'Europe méridionale comme l'Espagne où on le trouve dans la célèbre palmeraie d'Elche. Durant le début du 19^{ème} siècle, il a été introduit dans certaines zones de l'ouest du continent Américain [déserts du Colorado (USA) et de l'Atacama (Mexique)] (ZAID et de WET, 2002). Le palmer dattier est également présent, à plus faible échelle, aux Antilles, en Argentine et en Australie.

2.2. Importance économique du palmier dattier dans le monde et en Algérie

La production de dattes génère une importante activité commerciale et constitue une source de devises appréciables pour les pays producteurs. Cette production est principalement localisée dans les régions arides du nord de l'Afrique (Egypte, Algérie, Libye, Maroc, Tunisie, Soudan) et du sud-ouest de l'Asie (Iran, Arabie Saoudite, Iraq, Pakistan, Emirats Arabes Unis, Oman, Yémen, Qatar, Bahreïn, Jordanie).

2.2.1. Evolution de la production mondiale de dattes

La production mondiale de dattes a subi une augmentation appréciable entre 1961 et 2001. En 1961, elle a été de 1 800 000 tonnes, elle a atteint ensuite 2 800 000 tonnes en 1985 puis elle est passée à 5 000 000 tonnes en 1999 pour arriver à 5 400 000 tonnes en 2001. L'augmentation de 2 600 000 tonnes depuis 1985 représente une expansion annuelle d'environ 5% (BOTES et EMMENS, 2000 ; BOTES et ZAID, 2002). La même expansion annuelle a été enregistrée entre les années 2002 où la production mondiale a été de 6 405 178 tonnes et 2004 où cette dernière est passée 6 772 068 tonnes (Tableau I). En 2005, cette production a légèrement diminué (5 802 915 tonnes). En 2008, elle a atteint 6 962 420 tonnes. L'augmentation de 1 159 505 tonnes entre 2005 et 2008 représente une expansion annuelle d'environ 19%. Les plus grands pays producteurs de dattes durant la période 2005-2008 sont par ordre d'importance : l'Egypte, la République Islamique d'Iran, l'Arabie Saoudite, les Emirats Arabes Unies, le Pakistan, l'Algérie, l'Irak et le Soudan (Tableau I). La production de dattes est plus ou moins importante dans les pays suivants : Oman, Libye, Chine, Tunisie, Maroc, Yémen, Mauritanie, Qatar, Tchad, ... etc.

2.2.2. Evolution de la production de dattes en Algérie

En 1995, la production annuelle de dattes en Algérie a été estimée à 180 000 tonnes dont 44% représenté par la variété Deglet Nour.

Caractérisation morphologique et génétique de quelques isolats de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Killian & Maire) W. L. Gordon, agent causal de la fusariose du palmier dattier.

PAYS	PRODUCTION DATTES (en milliers de tonnes)						
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Egypte	1 115 000	1 115 000	1 100 000	1 170 000	328 720	1 313 696	1 326 133
Iran	875 000	875 000	880 000	996 770	1 000 000	1 000 000	1 000 000
Arabie Saoudite	829 000	830 000	830 000	970 488	977 036	982 546	982 546
Emirats Arabes Unis	760 000	7 60 000	760 000	750 000	757 600	755 000	755 000
Pakistan	650 000	650 000	650 000	496 576	426 281	557 524	680 107
Algérie	437 000	437 000	450 000	516 293	491 188	526 921	500 000
Irak	650 000	6 50 000	n.d*	404 000	432 000	440 000	440 000
Soudan	250 000	250 000	330 000	328 200	332 000	332 000	336 000
Oman	238 611	238 611	238 611	247 331	258 738	255 871	255 871
Libye	140 000	140 000	140 000	150 000	170 000	175 000	175 000
Chine	115 000	120 000	125 000	150 000	125 000	130 000	135 000
Tunisie	110 000	115 000	110 000	113 000	125 000	124 000	127 000
Maroc	33 200	33 200	54 110	47 500	45 470	74 300	72 700
Yémen	32 664	32 364	33 300	29 990	50 090	53 596	55 204
Mauritanie	24 000	24 000	24 000	22 000	20 000	22 000	22 000
Qatar	16 500	16 500	16 500	19 844	21 564	21 564	21 564
Tchad	18 000	18 000	18 000	18 000	18 000	18 300	18 300
USA	21 954	18 000	18 000	16 148	15 422	14 787	16 511
Bahreïn	16 508	16 508	17 000	n.d*	n.d*	13 293	13 293
.../...							
Production mondiale	6 405 178	6 412 226	6 772 068	5 802 915	6 627 777	6 827 775	6 962 420

Tableau I Production annuelle des principaux pays producteurs de dattes durant les années 2002-2008 (Statistiques FAO, 2008)

* = non déterminé

Avec cette production, l'Algérie a occupé le premier rang au Maghreb et le huitième rang mondial (SEDRA, 2003). En 2008, la production annuelle de dattes a atteint 500 000 tonnes ce qui classe l'Algérie au premier rang au Maghreb et au sixième rang mondial. Entre les années 2003 où la production a été de 437 000 tonnes et 2008 où celle-ci est passée à 500 000 tonnes, on note une augmentation de 63 000 tonnes ce qui représente une expansion annuelle d'environ 14%. Malgré cette augmentation, le tonnage de dattes exporté reste insuffisant. En effet, ce tonnage qui atteignait les 30 000 tonnes durant les années 1960 a chuté à moins de 10 000 tonnes entre les années 1990-2000 pour atteindre un niveau de 13 350 tonnes en 2007 (BELGUEDJ, 2009).

2.3. Quelques données botaniques et écologiques du palmier dattier

Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera* par Linné en 1734. Le nom générique *Phoenix* dérive du mot *Phoinix* (= Πηοινιχ) que les grecs attribuent au dattier car ils considèrent ce dernier comme l'arbre des Phéniciens. Le mot "*Phoenix*" qui est donné par les grecs à un oiseau légendaire qui renaissait de ces cendres, a été également attribué au palmier dattier en raison des possibilités de ce végétal de reprendre sa végétation après avoir été partiellement brûlé (Munier, 1973). L'épithète spécifique *dactylifera* (Gr. *Dactulos* = doigt + *fera* = porter) caractérise la forme du fruit qui rappelle celui d'un doigt (Munier, 1973 ; DJERBI, 1993).

2.3.1. Systématique du palmier dattier

Le palmier dattier est une angiosperme-monocotylédone qui appartient à la famille *Arecaceae* (= *Palmaceae*), à la classe *Coryphoideae* (= *Phoenicoideae*), à l'ordre *Arecales* (= *Palmales*) et au règne *Plantae* (dransfield et Uhl, 1986). La famille *Arecaceae* comporte 200 genres dont *Phoenix* et 1500 espèces (CORNER, 1966). Le genre *Phoenix* renferme une douzaine d'espèces dont *Phoenix dactylifera* L. (Chevalier, 1952). Toutes les espèces appartenant au genre *Phoenix* sont originaires des régions tropicales et subtropicales d'Afrique et du sud de l'Asie (Munier, 1973). Les espèces du genre *Phoenix* possèdent un nombre chromosomique $2n = 36$ et présentent une grande aptitude à s'hybrider entre eux ce qui entraîne une grande diversité génétique.

2.3.2. Description botanique du palmier dattier

Le palmier dattier est une plante dioïque. Son tronc ou stipe, cylindrique et non ramifié, peut atteindre sous certaines conditions une hauteur de 30 mètres (EL HADRAMI et EL HADRAMI, 2009) (Fig. 1). Ce tronc porte un bourgeon apical qui assure sa croissance longitudinale et se termine par une rosette ou couronne constituée par 100 à 120 feuilles appelées palmes (arabe = "Djerid"). Ces dernières sont insérées au niveau du stipe selon une hélice foliaire (Bouguedoura, 1979) par l'intermédiaire d'une gaine pétiolaire bien développée (arabe = "Cornaf"). La gaine pétiolaire est enfouie dans un fibrillum constituée par un feutrage filamenteux (arabe = "Lif"). Les palmes dont la longueur varie de 4 à 8

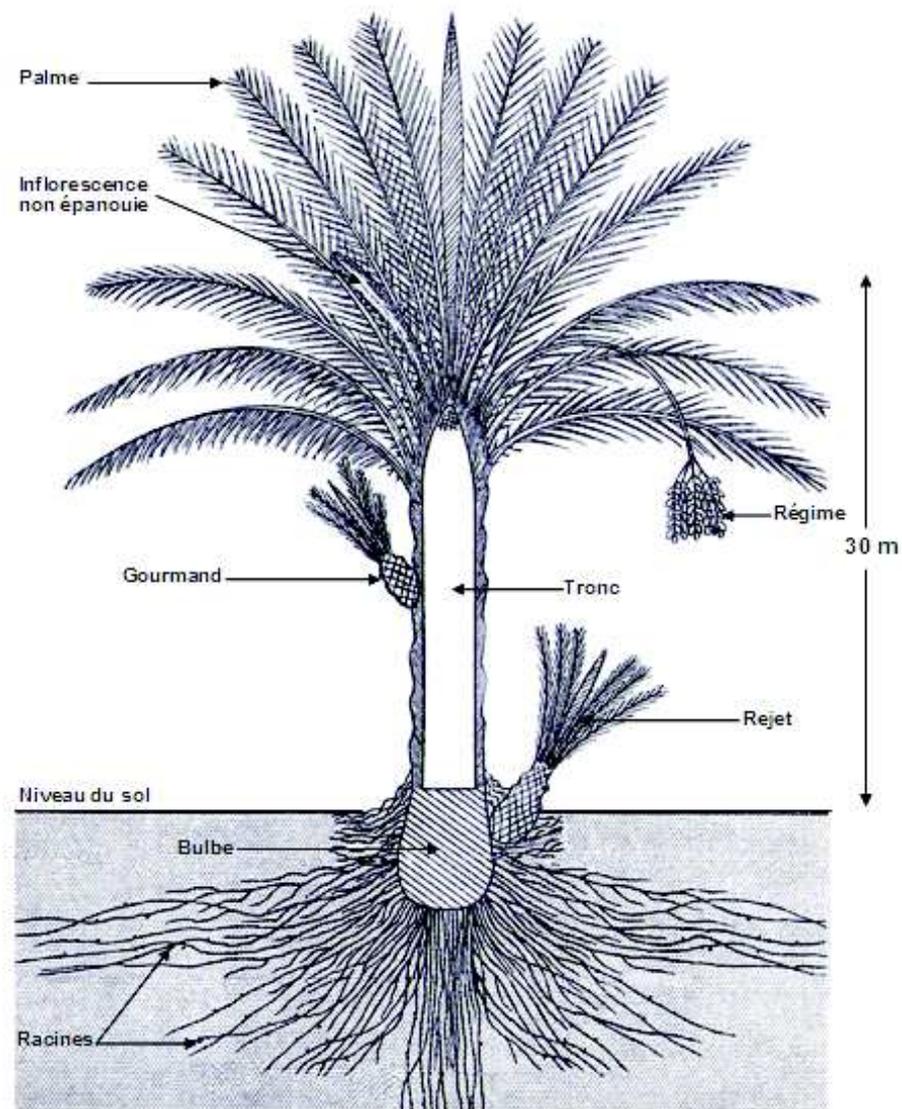


Figure 1 Figure schématique représentant les parties aériennes et souterraines du palmier dattier (D'après MUNIER, 1973)

mètres selon les cultivars, sont des feuilles composées, pennées. Leur limbe est constitué de folioles disposées en position oblique et pliées longitudinalement en gouttière. Les folioles les plus inférieures sont transformées en épines.

Chaque palme porte à son aisselle un bourgeon axillaire pouvant être végétative, floral ou intermédiaire (BOUGUEDOURA et *al.*, 1990 ; BOUGUEDOURA, 1991). Les bourgeons axillaires peuvent donner des rejets (arabe = "Djebars") sur le stipe ou à la base de celui-ci. Les rejets se forment durant la phase juvénile du palmier dattier. La transplantation de ces rejets (propagation par voie végétative) donne naissance à des palmiers qui ont les mêmes caractéristiques que le pied mère, contrairement à ce qu'on l'on peut obtenir par semis (propagation par voie sexuée). Les plants issus de semis (arabe = "Khalt") sont hétérozygotes et ne montrent pas les mêmes caractères que le pied mère.

Les inflorescences mâles et femelles appelées spadices émergent à partir des bourgeons axillaires situés à l'aisselle des palmes de la région coronaire. Les spadices sont

complètement enveloppés dans leur phase juvénile dans une grande bractée membraneuse ou spathe. Celle-ci s'ouvre d'elle-même selon la ligne médiane du dos (Munier, 1973). Etant donné la diécie du palmier dattier, chaque spadice porte les fleurs du même sexe. Les deux types de fleurs comportent un calice court, cupuliforme, formé de trois sépales soudés et une corolle constituée de trois pétales. Les fleurs mâles possèdent 6 étamines tandis que celles femelles comportent trois carpelles indépendants dont un seul se développe pour former le fruit.

La pollinisation du palmier dattier se fait habituellement par le vent (anémophile). Dans les régions phœnicicoles, le nombre de pieds mâles est volontairement réduit pour limiter ainsi la pollinisation naturelle par le vent. De ce fait, dans les zones de production, l'homme effectue une pollinisation manuelle. Le fruit du palmier dattier ou dattes (arabe = "Tmar") qui provient du développement de l'un des trois carpelles après fécondation de l'ovule est une baie qui contient une seule graine allongée de 2 à 3 cm de long que l'on considère, à tort, comme un noyau à cause de sa très grande dureté. Le péricarpe de la datte est composé d'un épicarpe (peau) très fin, d'un mésocarpe charnu et sucrée et d'un endocarpe membraneux, uni à la graine. Les dattes sont habituellement cylindriques, occasionnellement, arrondies ou ovoïdes. Leur longueur varie, selon les cultivars, de 2,50 à 7,50 cm de long et leur largeur est de 4 cm environ. La couleur du péricarpe est d'abord orange puis elle vire au brun à maturité.

Le système racinaire du palmier dattier qui est du type fasciculé est très développé. Les racines ne se ramifient pas et n'ont que très peu de radicelles. Le plateau racinaire ou bulbe est volumineux et émerge en partie au-dessus du niveau du sol. Le système racinaire comporte trois

types de racines : les racines dites respiratoires ou pneumatophores, celles dites de nutrition et celles dites d'absorption (Munier, 1973).

2.3.3. Quelques données écologiques du palmier dattier

Le palmier dattier est une espèce thermophile pouvant supporter des températures très élevées comprises entre 30 et 40°C dans les régions les plus chaudes du globe (MUNIER, 1973). Il est sensible au gel : les effets du froid se manifestent sur les organes végétatifs à partir de -6°C. Il exige une forte luminosité (espèce héliophile) et une faible humidité relative de l'air (optimum 40-44%) plus particulièrement durant les périodes de la floraison et de la maturation des dattes. Il tolère la sécheresse mais il est très exigeant en eau d'irrigation. En effet, le palmier dattier ne peut s'installer que dans des endroits où l'insuffisance des précipitations est compensée par les ressources hydriques souterraines. Il est tolérant à la salinité ; il peut supporter des eaux d'irrigation titrant 2 à 9 g de sel par litre (exprimés en chlorure de sodium). Il peut se développer dans des terrains assez divers (TOUTAIN, 1967) et s'accommoder de sols constitués uniquement de sable presque pur ou renfermant une forte teneur en argile (MUNIER, 1973 ; SEDRA, 2003).

2.4. Contraintes de la culture du palmier dattier

Le palmier dattier est confronté à plusieurs contraintes abiotiques (sécheresse, stress salin) qui sont principalement dues au fait qu'il se développe sous des conditions désertiques hostiles. Il est également confronté à plusieurs contraintes biotiques (Tableau II). Certains

ravageurs comme la pyrale ou ver de la datte, la cochenille blanche et le “Boufaroua” engendrent souvent des pertes économiques importantes sur la production de dattes. Une nouvelle maladie appelée “Maladie des feuilles cassantes” ou “Brittle leaf disease” à laquelle se trouve confronter le palmier dattier commence à prendre des proportions alarmantes. Cette maladie dont la cause demeure encore indéterminée a été découverte en Tunisie (Takrouni et *al.*, 1988; Triki et *al.*, 2003). Par la suite, elle a été signalée en Algérie dans les régions d’Adrar et du M’zab (Djerbi, 1983). Récemment, sa présence a été confirmée avec certitude dans la région de Biskra (Saadiet *al.*, 2006). Plusieurs maladies fongiques peuvent se développer sur le palmier dattier dont la plus grave est la fusariose vasculaire ou “bayoud”.

2.5. La Fusariose vasculaire du palmier dattier ou “Bayoud”

Le “bayoud” est largement distribué au niveau des palmeraies du sud marocain et du sud ouest algérien où il a respectivement provoqué la mort de 10 et 3 millions d’arbres (Brochard et Dubost, 1970 ; Dubost et Kada, 1974, DJERBI, 1988). Dans la plupart des oasis infestées, le bayoud a fait disparaître les meilleures variétés de renommée mondiale tel que Berni et Idrar au Maroc et Deglet Nour dans le sud ouest algérien au profit de cultivars peu productifs et de mauvaise qualité (Saaidi, 1979 ; Djerbiet *al.*, 1986 ; SEDRA, 2003).

NOMS COMMUNS	AGENTS CAUSAUX	FREQUENCE
MALADIES FONGIQUES :		
"Bayoud" ou Fusariose vasculaire	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> (Killian et Maire) Gordon	+++
"Khamedj" ou Pourriture des inflorescences	<i>Mauginiella scottiae</i> Cavara <i>Fusarium moniliforme</i> J. Sheld	++
Pourriture sèche des inflorescences	<i>Thielaviopsis paradoxa</i> (De Seynes) Höhn	+/-
Dépérissement noir de l'organe végétatif	<i>Thielaviopsis paradoxa</i> (De Seynes) Höhn	+
Pourriture du cœur et du stipe	<i>Thielaviopsis paradoxa</i> (De Seynes) Höhn <i>Gliocladium vernoosenii</i> (Blourge) Thom <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon & Maubl. ... etc.	+/-
Maladie à <i>Diplodia</i>	<i>Diplodia phoenicum</i> (Sacc.) H. S. Fawc. & Klotz	+
Taches brunes des palmes	<i>Mycosphaerella tassiana</i> (De Not.) Johanson	+
"Belaat" ou avalement du cœur	<i>Phytophthora</i> sp. <i>Gliocladium vernoosenii</i> (Blourge) Thom <i>Thielaviopsis paradoxa</i> (De Seynes) Höhn	+
Maladie du "cœur qui penche"	<i>Thielaviopsis paradoxa</i> (De Seynes) Höhn et/ou autres champignons	+
Faux charbon des folioles	<i>Graphiola phoenicis</i> (Moug.) Poit.	+/-
Pourritures des fruits	<i>Alternaria</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Macrosporium</i> sp., ... etc.	+
Dessèchement apical des palmes	<i>Alternaria</i> sp., <i>Chalara</i> sp.	+
MALADIE D'ORIGINE INCONNUE :		
Maladie des feuilles cassantes	Phytoplasmes ?, viroides ?, maladies physiologiques ?	++
RAVAGEURS :		
Pyrale ou ver de la datté	<i>Ectomyelois ceratoniae</i> (Zeller, 1839)	+++
Cochenille blanche	<i>Parlatona blanchardi</i> (Targioni Tozzetti, 1892)	+++
"Boufaroua" ou acariose des dattes	<i>Oligonychus afrasiaticus</i> (McGregor, 1939)	+++
Cochenille rouge	<i>Phoenicococcus marlatti</i> (Cockerell, 1899)	?

Tableau II Fréquence des principales maladies et des ravageurs du palmier dattier en Algérie (D'après MUNIER, 1973 et Sedra, 2003)

2.5.1. Origine et distribution géographique du "bayoud"

Le "bayoud" est apparu au Maroc dans la vallée du Drâa au nord de Zagora vers 1870. Il a été introduit en Algérie par les oasis frontalières de Béni Ounif en 1898, Béchar et Béni Abbès en 1908. De là, il s'est propagé dans les régions du Touat, du Gourara et du Tidikelt. Actuellement, il est présent dans les oasis centrales et occidentales (TOUTAIN, 1965 ; BENZAZA et al., 1970 ; BROCHARD et DUBOST, 1970, DUBOST, 1972). Il a atteint Metlili en 1950, Ghardaïa en 1965 et El-Goléa en 1978 où il a été éradiqué (DUBOST et KADA, 1975 ; DJERBI, 1982). La progression du bayoud du sud-ouest vers le sud-est constitue une menace pour les oasis des Zibans, de la vallée de l'oued Rhir et ceux de la frontière tunisienne.

2.5.2. Symptomatologie du “bayoud”

Les symptômes externes typiques se caractérisent par un dessèchement unilatéral de la palme qui progresse de bas en haut (Fig. 2A). Celui-ci se poursuit de l'autre coté de la palme en progressant cette fois-ci de haut en bas. Ce dessèchement s'accompagne d'une strie brune longitudinale sur le rachis de la palme atteinte (SEDRA, 2003) (Fig. 2B). Cette strie correspond au passage du mycélium dans les vaisseaux du rachis (Fig. 2C). Généralement, le dessèchement apparaît d'abord sur une ou plusieurs palmes de la couronne moyenne (Fig. 2D). Ensuite, il progresse vers les palmes du centre pour atteindre le cœur de l'arbre qui meurt quand le mycélium atteint le bourgeon terminal (Fig. 2E). Les palmes desséchées prennent souvent l'aspect de plume mouillée (Fig. 2E) et deviennent blanchâtres d'où le nom de “bayoud” donné à la maladie (du mot arabe “abiad” qui signifie blanc et qui se réfère au blanchiment des palmes des arbres malades) (Djerbi, 1990a). Des coupes transversales et longitudinales du stipe d'un palmier malade montrent une coloration brun-rougeâtre des faisceaux libéro-ligneux.

2.5.3. L'agent causal de la fusariose du palmier dattier”

Les premières études de l'agent causal du bayoud ont été réalisées par SERGENT et BEGUET (1921) puis par KILLIAN et MAIRE (1930). Ces derniers le décrivent sous le nom de *Cylindrophora albedinis* Killian & Maire. Par la suite, il a été dénommé *Fusarium albedinis* (Kill. & Maire) Malençon par MALENÇON (1934), puis renommé *Fusarium oxysporum* var. *albedinis* (Kill. & Maire) Malençon par Malençon (1950) et enfin *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Kill. & Maire) W.L. Gordon (*F.o.a*) par GORDON (1965).

2.5.3.1. Position taxonomique de *F.o.a*.

Le *F.o.a*. n'est connu que sous sa forme anamorphique qui est rattachée au genre téléomorphique *Gibberella* Sacc. Celui-ci appartient à la famille *Nectriaceae*, à l'ordre *Hypocreales*, à la classe *Sordariomycetes* [= Pyrénomycètes sensu LUTTRELL (1955)], au phylum *Ascomycota* et au règne *Fungi*. (ERIKSSON et WINKA, 1997 ; ERIKSSON 2006). La forme anamorphique est classée dans le groupe artificiel des *Fungi imperfecti* (= Deutéromycètes) parmi la famille des *Tuberculariaceae* et l'ordre des *Moniliales*.



Figure 3 Symptomatologie de la fusariose du palmier dattier.

A : Palmes montrant un dessèchement unilatérale (à gauche) et totale (à droite).

B : Palme montrant sur le rachis une strie longitudinale brunâtre.

C : Coupe longitudinale au niveau du rachis montrant une coloration brune correspondant au passage du mycélium dans les vaisseaux du rachis (flèche).

D : Dessèchement des palmes de la couronne moyenne, les palmes du centre sont encore vertes.

E : Dessèchement de toutes les palmes de la couronne y compris celle du centre ; remarquer l'aspect de plume mouillée de certaines palmes (flèche).

2.5.3.2. Caractéristiques morphologiques et biologiques de *F.o.a*

Le *F.o.a.* est un champignon tellurique dont la température de croissance optimale *in vitro* est comprise entre 21°C et 27,5°C. Sa croissance reste importante entre 18°C et 32°C mais elle s'arrête à 7°C et 37°C (Bounaga, 1975). Il produit sur milieu PDA (= Potato

Dextrose Agar) un mycélium ras, fin, clair et frisé. Habituellement, des sporodochies, de couleur rose saumon, se forment le long des hyphes mycéliens. La reproduction asexuée se réalise par des microphialides et des macrophialides qui différencient respectivement des microconidies et des macroconidies. Les microphialides courtes, renflées à la base, pointues et effilées, implantées perpendiculairement aux hyphes mycéliens donnent naissance à leur sommet des microconidies hyalines, souvent unicellulaires, rarement bicellulaires dont la forme et les dimensions (3-15 x 3-5 μm) sont variables (Fig. 4A). Les macrophialides plus grandes que les microphialides, groupées en arbuscules pour former habituellement des sporodochies, plus rarement des pionnotes, produisent de nombreuses macroconidies dont les sommets sont pointus et dont les bases sont pédiformes et courtes (Fig.4B). Ces macroconidies présentent, le plus souvent, 3 cloisons transversales parfois 4 à 5. Leurs dimensions varient avec les conditions du milieu (20-35 x 3-5 μm). Dans les cultures âgées et dans le sol, le *F.o.a.* différencie sur le mycélium ou sur les macroconidies des chlamydo-spores qui sont sphériques, intercalaires ou terminales et dont le diamètre varie de 6 à 20 μm (Fig. 4C). Parfois, il apparaît dans le milieu des sclérotés petits (100 à 200 μm) de couleur bleue ou noire (Fig. 4D).

2.5.4. Cycle biologique de la fusariose vasculaire du palmier dattier

Le cycle de la fusariose du palmier dattier est illustré par la figure 5 (SEDRA, 2003). Le *F.o.a.* survit occasionnellement dans les tissus vasculaires du palmier dattier. En l'absence de l'hôte, il se conserve dans le sol sous forme de chlamydo-spores et de mycélium dans les tissus de palmiers malades (racines, rachis, ... etc.). Il peut aussi survivre dans les porteurs sains tels que le henné, la luzerne ou le trèfle. Sa répartition dans le sol est variable, on le trouve entre 0 et 30 cm, mais parfois jusqu'à 1 m (Tantaoui, 1989).

La maladie est initiée par un petit nombre de propagules (mycélium ou chlamydo-spores). Dès que les conditions deviennent favorables dans le sol, les chlamydo-spores germent pour donner un mycélium qui pénètre dans les tissus vasculaires des racines à partir desquels il atteint le stipe. Dans les vaisseaux, le mycélium produit des microconidies qui sont transportées vers le haut par le mouvement de sève brute. Quand ce mouvement est empêché par une paroi transversale, les microconidies germent, le tube germinatif pénètre la paroi et la formation de microconidies reprend de l'autre côté de la paroi. La mort de l'arbre intervient quand le champignon atteint avec ses toxines le bourgeon terminal. Au cours de sa progression, le *F.o.a.* colonise le pa-

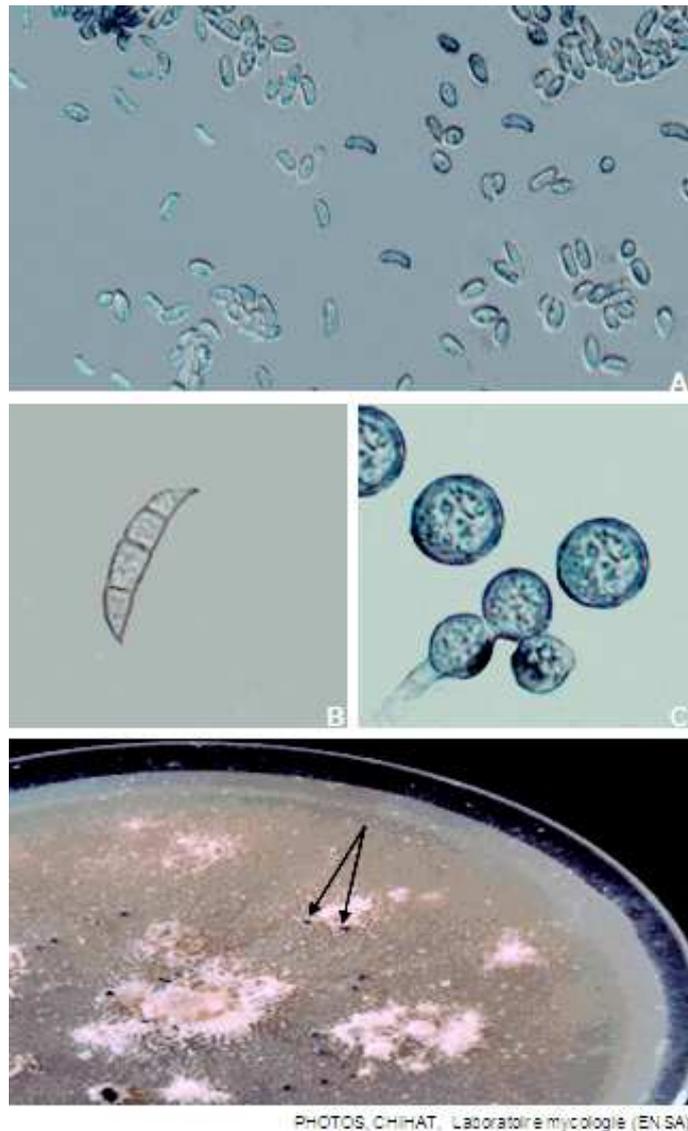


Figure 4 Caractéristiques microscopiques et macroscopiques de *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*.

- (A) Microconidies (x 160).
- (B) Macroconidie avec 3 cloisons transversales (x 320).
- (C) Chlamydospores isolées (x 320)..
- (D) Portion d'une boîte de Pétri contenant un milieu de culture PDA sur lequel se sont formés des sclérotes (flèches).

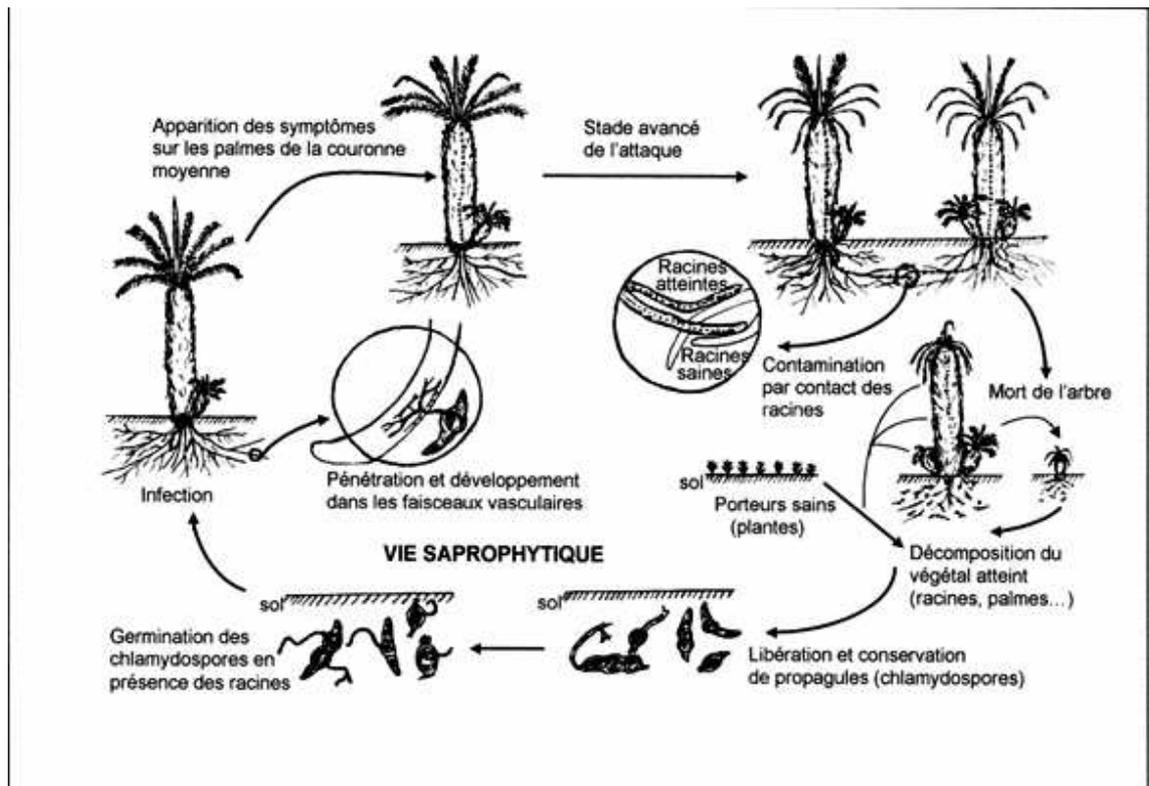


Figure 4 Cycle biologique du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du bayoud (D'après SEDRA, 1993 e)

renchyme ligneux par un mycélium inter et intracellulaire, c'est ce qui donne plus tard la coloration brun rougeâtre caractéristique des vaisseaux du xylème. Après la mort de l'arbre, le mycélium continue à se développer dans les tissus morts et forme de nombreuses chlamydo-spores dans les cellules du sclérenchyme (Louvet, 1977). La désintégration des tissus malades permet la libération des chlamydo-spores qui peuvent se conserver pendant plus de 10 ans dans le sol et former par la suite de nouveaux micro-foyers. La contamination d'un palmier à un autre se fait soit par contact des racines d'un arbre malade avec celles d'un arbre sain, soit par les travaux du sol, soit par les eaux d'irrigation.

2.6. CARACTERISATION DE L'AGENT CAUSAL DU BAYOUD

La caractérisation de l'agent causal du bayoud peut se réaliser par ses caractéristiques culturales et morphologiques, par le test de pathogénicité qui consiste à inoculer de jeunes plantules, par la compatibilité végétative et par des marqueurs moléculaires.

2.6.1. Caractérisation culturale et morphologique

Lors des premiers isollements à partir de rachis infectés, de porteurs sains (henné, luzerne... etc.) ou du sol, le *F.o.a.* présente sur les milieux PDA, Czapek-Dox et Richard un aspect cultural stable appelé type sauvage qui correspond à la forme typique caractérisée par

un mycélium fin frisé, ras, grassex de couleur rose saumon et de croissance lente (DJERBI, 1990a). Dès les premiers repiquages par transfert en masse, le *F.o.a.* perd sa forme caractéristique et présente un polymorphisme très marqué (CHETTAB *et al.*, 1978 ; SEDRA et DJERBI, 1985 ; DJERBI *et al.*, 1985 ; DJERBI, 1990a). Afin de maintenir les caractéristiques culturelles du type sauvage au cours des repiquages successifs, on a recours à des cultures monospores qui permettent de conserver non seulement le type sauvage, mais aussi de le régénérer à partir de cultures atypiques. En outre, les colonies de *F.o.a.* issues des premiers isollements à partir de rachis infectés, de porteurs sains (henné, luzerne... etc.) ou du sol peuvent donner naissance, sur milieu PDA, à 4 types morphologiques différents qui peuvent être subdivisés en 2 catégories dont la première renferme un seul type dit sporodochial qui correspond au type sauvage de *F.o.a.*, la deuxième comporte trois formes atypiques (= non sauvages) qui sont appelés : type morphologique cotonneux, type sclérotique et type sporodochial non sauvage (SEDRA, 2003).

2.6.2. Caractérisation de *F.o.a.* par la compatibilité végétative

La compatibilité végétative ou "vegetative compatibility" (VC) se réfère à la capacité de deux souches d'un champignon à fusionner pour former un hétérocaryon. La formation de l'hétérocaryon est un moyen par lequel un champignon haploïde devient un diploïde fonctionnel et acquiert ainsi le bénéfice de la complémentation ou hétérosis (Leslie, 1993). La plupart des champignons (ascomycètes et basidiomycètes) possèdent des systèmes génétiques complexes qui gouvernent la compatibilité et qui consistent en une série de gènes bi- ou multialléliques localisés aux loci *het* de l'incompatibilité

hétérogénique ("heterogenic incompatibility"). Les produits de ces gènes servent comme médiateurs soit pour la compatibilité, soit pour l'incompatibilité végétative qui conduit à la lyse cellulaire après fusion hyphale. Pour que deux souches d'un même champignon soient végétativement compatibles c'est-à-dire capables de fusionner, il faut que les allèles situées à tous les loci *het* soient identiques (CORRELL *et al.*, 1987 ; KISTLER, 1997). Ces souches qui formeront des hétérocaryons appartiennent au même groupe de compatibilité végétative (VCG = "vegetative compatibility group") (LESLIE, 2006). L'identification des VCG implique la création de mutants auxotrophes sur un milieu chlorate (mutants "*nit*") incapables d'utiliser les nitrates comme source d'azote. Trois classes phénotypiques ont été ainsi distinguées par CORRELL *et al.* (1987). : "*nit1*", "*nit3*", et "*nitM*". Ces trois classes reflètent les sites de mutations. Les mutants "*nit1*" dont la mutation s'est produite au niveau du gène de structure de la nitrate réductase, ne peuvent pas utiliser NaNO_3 comme source d'azote mais peuvent utiliser d'autres composés azotiques tels que les nitrites et l'hypoxanthine. Les mutants "*nit3*" où la mutation s'est produite au site du gène de régulation des nitrate et nitrite réductases qui ne peuvent pas utiliser NaNO_3 et NaNO_2 mais peuvent utiliser l'hypoxanthine. Les mutants "*nitM*" où la mutation porte sur un des gènes impliqués dans la synthèse d'un cofacteur à molybdène nécessaire à l'activité de la nitrate réductase et de la purine déshydrogénase, ne peuvent pas utiliser NaNO_3 et l'hypoxanthine mais peuvent utiliser NaNO_2 . Ces mutants sont ensuite appariés sur un milieu minimal ; les souches qui fusionnent pour produire un hétérocaryon se complémentent et donnent une croissance du type sauvage. Ces souches appartiennent au même groupe de compatibilité végétative.

La technique de la compatibilité végétative a été utilisée par Puhalla (1985) pour classer les souches de *Fusarium oxysporum* et déterminer ainsi des groupes de compatibilité

végétative. L'application de cette technique à des isolats de *F.o.a.* issus de palmes infectées et de *F.o.* isolés à partir de racines ou de la rhizosphère de palmier atteint a montré que les isolats de *F.o.a.* et ceux de *F.o.* appartiennent à des groupes de compatibilité végétative différents (TANTAOUI et BOISSON, 1991, OUINTEN, 1991). De même, l'application de cette technique à plusieurs isolats de *F.o.a.* provenant de palmeraies marocaines et algériennes a montré que ces derniers appartiennent au même groupe de compatibilité végétative (TANTAOUI et *al.*, 1996 ; OUINTEN, 1996).

2.6.3. Caractérisation du *F.o.a.* par les marqueurs moléculaires

Dans le but d'identifier et de caractériser génétiquement le *F.o.a.*, différents marqueurs génétiques comme la RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"), la PCR ("Polymerase Chain Reaction") et la RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") ont été utilisés

2.6.3.1. RFLP

La RFLP permet de détecter des variations des séquences au niveau des sites de restriction. Elle est utilisée pour étudier le polymorphisme génomique. L'analyse du po-

lymorphisme de l'ADN ribosomal (ADNr) et de l'ADN mitochondrial (ADNmt) d'isolats de *F.o.a.* et de *F.o.* a montré que les profils de restriction de l'ADNr ne mettent pas en évidence le polymorphisme entre les isolats de *F.o.a.* et ceux de *F.o.*, par contre, ceux de l'ADNmt révèlent un polymorphisme entre les isolats de *F.o.a.* et ceux de *F.o.* (TANTAOUI et FERNANDEZ, 1993). D'autre part, l'étude de la diversité génétique de *F.o.a.* par l'analyse de l'ADNmt n'a permis de révéler aucun polymorphisme entre les isolats de *F.o.a.* testés (TANTAOUI et *al.*, 1996 ; OUINTEN, 1996).

2.6.3.2. PCR

L'identification de *F.o.a.* est actuellement réalisable par la PCR. Deux paires d'amorce TL3/FOA28 et BIO3/FOA1 ont été synthétisés par FERNANDEZ et *al.*, (1998). Ces deux paires d'amorce ont été testées pour amplifier l'ADN des isolats de différentes espèces et formes spéciales appartenant au genre *Fusarium*. Le couple d'amorce TL3/FOA28 (GGTCGTCC GCAGAGTATACCGGC / ATCCCCGTAAAGCCCTGAAGC) a permis d'amplifier les fragments d'ADN de 400 pb de tous les isolats de *F.o.a.*, par contre la paire BIO3/FOA1 (GGCGATCTTGAT TGTATTGTGGTG / CAGTTTATTAGAAATGCCGCC) a permis l'amplification des fragments d'ADN de 204 pb pour 95% des isolats de *F.o.a.* testés. Aucune amplification n'a été observée chez les isolats des autres espèces et formes spéciales de *Fusarium* testées (FERNANDEZ, et *al.*, 1998). Ce test permet donc de différencier le *F.o.a.* des autres espèces et formes spéciales de *Fusarium* ainsi que des souches saprophytes de *F.o.* (OEPP, 2003).

2.6.3.3. RAPD

La RAPD a été utilisée pour étudier la diversité génétique des populations de *F.o.a.* Trois amorces oligonucléotidiques OPF4, OPF12 et OPF13 ont été utilisées pour amplifier l'ADN de plusieurs isolats de *F.o.a.* provenant de palmeraies marocaines auxquels on a inclus deux isolats algériens (TANTAOUI et *al.*, 1996). Les profils électrophorétique obtenus n'ont montré aucun polymorphisme entre tous les isolats de *F.o.a.* testés. Ceci semble indiquer que les populations marocaines de *F.o.a.* appartiennent à une seule lignée clonale qui a

pris naissance au Maroc et qui s'est étendue éventuellement aux palmeraies algériennes. Plusieurs amorces nucléotidiques OPF1, OPF4, OPF5, OPF6, OPF8, OPF12 et OPF13 ont été également utilisées pour amplifier l'ADN de plusieurs isolats provenant de palmeraies algériennes (OUINTEN, 1996). Deux de ces sept amorces (OPF13 et OPF4) ont permis de révéler un polymorphisme supérieur à 10%. Malgré ce polymorphisme, les profils d'amplification présentent plus de 95% de similarité. Ceci indique que les isolats algériens de *F.o.a.* sont génétiquement très proches et semblent avoir une même origine phylogénétique.

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. MATERIELS :

3.1.1. Isolats fongiques

Quarante quatre (44) isolats provenant des palmeraies des wilayates d'Adrar et de Ghardaïa ont été utilisés. Neuf de ces isolats nous ont été fournis par la station de l'INRAA (Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie) d'Adrar, six proviennent de la station de l'INPV (Institut National de la Protection des Végétaux) de Ghardaïa et vingt neuf ont été collectés lors de prospections réalisées durant l'année 2008 au niveau des palmeraies de la région de la wilaya d'Adrar. Les codifications utilisées pour la désignation des différents isolats comportent dans l'ordre : une lettre S (= souche), un nombre choisi aléatoirement, deux chiffres correspondant à l'année d'isolement et deux lettres indiquant l'abréviation de la wilaya (AD = Adrar et GH = Ghardaïa). L'origine géographique, l'année d'isolement et le cultivar à partir duquel l'isolat a été obtenu sont indiqués dans le tableau III.

3.1.2. Milieux de culture

L'isolement et la conservation des isolats de *F.o.a.* ainsi que la caractérisation culturelle et morphologique ont été réalisés sur le milieu Komada et PDA. L'étude de la croissance radiale a été effectuée sur trois milieux de culture différents : PDA, MALT et SABOURAUD. La composition des milieux cités ci-dessus est indiquée dans l'annexe 1. En ce qui concerne la compatibilité végétative, nous avons utilisé le milieu chlorate KPS15 et le milieu MM enrichi d'une solution d'oligoéléments. La composition de ces deux derniers milieux est indiquée dans l'annexe 2.

3.1.3. Amorces oligonucléotidiques

L'amplification de l'ADN des 40 isolats de *F.o.a.* avec 7 amorces nucléotidiques (Eurofins MWG Operon) OPF1, OPF4, OPF5, OPF6, OPF8, OPF12 et OPF13 dont les séquences respectives sont : ACGGATCCTG, GGTAATTCCC, CCGAATTCCC, GGAATTCGG, GGGATATCGG, ACGGTACCAG et GGCTGCAGAA.

3.2. METHODES

3.2.1. Isolements des souches de *F.o.a.*

Neuf et six isolats provenant respectivement des stations de l'INRAA (Adrar) et de l'INPV (Ghardaïa) ont été isolés sur un milieu PDA à partir de rachis. Sur les 29 isolats restants, 25 ont été isolés à partir de rachis prélevés à partir de palmiers montrant les symptômes

typiques du bayoud et 4 ont été obtenus à partir d'échantillons de sol prélevés à une profondeur comprise entre 20 à .30 cm au niveau de palmeraies infestées.

ISOLATS	ANNEES	CULTIVARS	ORIGINES	WILLAYATES
S01-02-AD	2002	Tilimsou	Talmine	Adrar
S02-02-AD	2002	Tegaza	Timmi	Adrar
S03-02-AD	2002	Tegaza	Timmi	Adrar
S04-02-AD	2002	Tegaza	Bouda	Adrar
S05-02-AD	2002	Tinasser	Ouled Aissa	Adrar
S06-02-AD	2002	Tinasser	Timogten	Adrar
S07-02-AD	2002	Tegaza	Timogten	Adrar
S08-02-AD	2002	Tegaza	Timmi	Adrar
S09-02-AD	2002	Tegaza	Timmi	Adrar
S10-08-AD	2008	Tegaza	Bouda	Adrar
S11-07-GH	2007	khait*	INPV	Ghardaia
S12-04-GH	2004	khait	INPV	Ghardaia
S13-06-GH	2006	khait	INPV	Ghardaia
S14-06-GH	2006	khait	INPV	Ghardaia
S15-06-GH	2006	khait	INPV	Ghardaia
S16-03-GH	2003	khait	INPV	Ghardaia
S17-08-AD	2008	khait	Bouda	Adrar
S18-08-AD	2008	khait	Bouda	Adrar
S19-08-AD	2008	Tegaza	Bouda	Adrar
S20-08-AD	2008	Tegaza	Ouled Ahmed	Adrar
S21-08-AD	2008	Tilimsou	Mahdia	Adrar
S22-08-AD	2008	khait	Mahdia	Adrar
S23-08-AD	2008	khait	Bouda	Adrar
S24-08-AD	2008	khaitt	Tillène	Adrar
S25-08-AD	2008	Tegaza	Ouled Arossa	Adrar
S26-08-AD	2008	Tegaza	Ouled Ahmed	Adrar
S27-08-AD	2008	Tegaza	Ouled Ahmed	Adrar
S28-08-AD	2008	Tegaza	Ouled Ali	Adrar
S29-08-AD	2008	khait	Mahdia	Adrar
S30-08-AD	2008	khait	Mahdia	Adrar
S31-08-AD	2008	khait	Mahdia	Adrar
S32-08-AD	2008	Tegaza	Tillène	Adrar
S33-08-AD	2008	Tilimsou	Mahdia	Adrar
S34-08-AD	2008	Tegaza	Ouled Ali	Adrar
S35-08-AD	2008	Tilimsou	Mahdia	Adrar
S36-08-AD	2008	Tegaza	Bouda	Adrar
S37-08-AD	2008	Tegaza	Ouled Ahmed	Adrar
S38-08-AD	2008	Tegaza	Ouled Ali	Adrar
S39-08-AD	2008	Tegaza	Tillène	Adrar
S40-08-AD	2008	Tegaza	Tillène	Adrar
S41-08-AD	2008	Tilimsou	Mahdia	Adrar
S42-08-AD	2008	khait	Bouda	Adrar
S43-08-AD	2008	Tegaza	Tillène	Adrar
S44-08-AD	2008	khait	Tillène	Adrar

TABLEAU III Désignation, années d'isolement et origines des isolats de F.o.a.

Les 40 premiers isolats ont été obtenus à partir de rachis infectés, les 4 derniers à partir d'échantillons de sol provenant de palmeraies infestées.

* Khait = plants issus de semis

3.2.1.1. Isolements des souches à partir de rachis

Des morceaux de rachis infectés ont été défoliés, puis désinfectés avec un coton imbibé d'alcool éthylique et passés rapidement sous la flamme d'un bec bunsen afin d'éliminer les parasites de faiblesse et les saprophytes. Les morceaux de rachis sont ensuite découpés en petits fragments de 3 à 4 mm de longueur à l'aide d'un sécateur flambé, plongés dans de l'eau de javel commerciale (hypochlorite de sodium) à 12° pendant 15 minutes, rincés à trois reprises dans de l'eau distillée stérile, séchés entre deux papiers filtres préalablement stérilisés et enfin déposés dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture PDA.

Trois à cinq fragments de rachis sont déposés au niveau de chaque boîte de Pétri. Les cultures sont ensuite mises à incuber sous la lumière de jour et à une température ambiante comprise entre 18 et 22°C.

3.2.1.2. Isolements des souches à partir du sol

L'isolement des souches à partir du sol a été réalisé selon la technique des suspensions dilutions décrite par Rapilly (1968). Dix grammes de sol sont préalablement broyés à sec dans un mortier stérile, séchés à 30°C dans une étuve, puis mis en suspension dans 90 ml d'eau distillée stérile et enfin agités mécaniquement pendant 30 minutes afin de mettre en suspension les particules de sol ainsi que les spores et le mycélium qui y adhèrent. La suspension obtenue correspond à la dilution 1. On prélève aseptiquement 10 ml de cette dilution que l'on met dans 90 ml d'eau stérile, on obtient ainsi la dilution 2 que l'on agite mécaniquement. En prélevant toujours le même volume, on pratique ainsi des dilutions successives jusqu'à la dilution 8. Un millilitre de chaque dilution est incorporé à 20 ml de milieu Komada puis coulé dans des boîtes de Pétri. Ces dernières sont mises à incuber dans une chambre de culture à une température de 18 à 22°C et sous une lumière continue. Après 4 à 5 jours d'incubation on note l'apparition des colonies.

3.2.2. Purification et conservation des souches

A partir de cultures âgées de 15 jours issus de fragments de rachis ou de sol de palmeraies infectées, on prélève des extrémités d'hyphes que l'on repique dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture PDA acidifié (pH 5,4) à l'aide d'une solution d'acide phosphorique et additionné de 100 mg d'oxytétracycline afin d'éliminer les contaminations bactériennes. La purification des souches a été ensuite réalisée par repiquages successifs.

Etant donné le polymorphisme des caractéristiques culturelles des souches sauvages de *F.o.a.*, nous avons eu recours à la culture monospore (SNYDER et HANSEN, 1954 ; CHETTAB et *al.*, 1978 ; SEDRA et DJERBI, 1985). Pour cela, on prélève à partir d'une culture de *F.o.a.* âgée de 7 à 15 jours un explant de 5 mm de diamètre. Celui-ci est ensuite déposé dans un tube à essai contenant 10 ml d'eau distillée stérile. Afin de libérer les conidies, le tube est agité à l'aide d'un vortex. La suspension ainsi obtenue est diluée jusqu'à obtenir une concentration de 1 à 10

spores par millilitre. Un demi millilitre de cette suspension est étalé dans chaque boîte de Pétri contenant un milieu à base d'eau gélosée à 2%. Les cultures sont ensuite incubées pendant 48 heures à la température ambiante (18-25°C) et sous une lumière artificielle continue. Les spores germées sont ensuite repérées à l'aide d'une loupe binoculaire, puis prélevées à l'aide d'une pipette pasteur étirée et repiquées aseptiquement dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture PDA. Les cultures monospores sont ensuite mises à incuber pendant 7 jours à la température ambiante et sous une lumière artificielle continue. Les isolats, une fois purifiés, sont conservés à 4°C dans des tubes inclinés contenant un milieu PDA.

3.2.3. Caractérisation culturelle et morphologique des isolats de *F.o.a.*

La caractérisation culturelle et morphologique des isolats de *F.o.a.* a porté sur les caractéristiques de la croissance en culture des isolats sur divers milieux de culture et à différentes températures.

3.2.3.1. Caractéristiques culturelles des isolats de *F.o.a.*

Les caractéristiques culturelles des isolats de *F.o.a.* ont porté essentiellement sur l'aspect et la couleur du mycélium. L'évaluation de ces caractéristiques a été réalisée à partir d'explants de 5 mm de diamètre prélevés aseptiquement à l'aide d'un emporte pièce stérile à la périphérie de cultures monospores âgées de 7 jours et incubées à une température de 22°C et sous une lumière continue. Les explants sont ensuite transférés au centre de boîtes de Pétri contenant un milieu PDA fraîchement préparé. Après une incubation de 10 à 15 jours à une température de 22°C et sous une lumière continue, on note pour chaque isolat l'aspect et la couleur du mycélium.

3.2.3.2. Croissance mycélienne radiale des isolats de *F.o.a.* sur différents milieux de cultures

La croissance mycélienne radiale des isolats de *F.o.a.* et de *F.o.* a été réalisée sur trois milieux de culture : PDA, Malt et Sabouraud. A partir de chaque isolat obtenu par culture monospore, on prélève à l'aide d'un emporte pièce et à la périphérie de chaque colonie âgée de 7 jours des explants de 5 mm de diamètre. Ces derniers sont ensuite placés sens dessus dessous au centre de boîtes de Pétri contenant l'un des milieux de culture cités ci-dessus. Trois répétitions sont réalisées pour chaque isolat de *F.o.a.* Les cultures ainsi obtenus sont mises à incuber à une température de 22°C et sous une lumière artificielle continue. Des mesures quotidiennes du diamètre moyen des colonies ont été réalisées afin de déterminer la croissance radiale des colonies selon la formule suivante (RAPILLY, 1968) :

3.2.3.3. Croissance mycélienne radiale des isolats de *F.o.a.* sous différentes températures

La croissance mycélienne radiale des isolats de *F.o.a.* et de *F.o.* a été réalisée sur milieu de culture PDA, à l'obscurité et sous différentes températures : 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40°C. A partir de chaque isolat obtenu par culture monospore, on prélève à l'aide d'un emporte pièce et à la périphérie de chaque colonie âgée de 7 jours des explants de 5 mm de diamètre. Ces derniers sont ensuite placés sens dessus dessous au centre de boîtes de Pétri contenant un milieu de culture PDA fraîchement préparé. Trois répétitions sont réalisées pour chaque isolat et pour chaque température. Les cultures sont ensuite mises à incuber aux différentes températures et à l'obscurité. Des mesures quotidiennes de la croissance radiale des colonies sont ensuite réalisées pendant une semaine sous une loupe binoculaire.

Les valeurs obtenues de la croissance mycélienne sous différentes températures ont fait l'objet d'une analyse de la variance et d'un test LSD à 95% à l'aide du logiciel STATGRAPHICS version 5.2 afin de déterminer des groupes d'isolats ayant les mêmes caractéristiques.

3.2.4. Caractérisation des isolats de *F.o.a.* par la technique de la compatibilité végétative

La technique de la compatibilité végétative ou la capacité de former des hétérocaryons (PUHALLA, 1985) se base sur la génétique du champignon. Afin de confirmer l'identification des isolats, la compatibilité végétative des mutants "*nit*" a été réalisée sur les 44 souches.

3.2.4.1. Principe de la compatibilité végétative

Les champignons sont généralement capables de réduire le nitrate (NaNO_3) en nitrite (NaNO_2) par l'enzyme nitrate réductase codée par un gène de structure. Le chlorate (KClO_3) qui est un analogue structural du nitrate peut être réduit par la nitrate réductase en chlorite (KClO_2). Celui-ci est un composé toxique pour les cham-

pignons. Les isolats ayant subi une mutation pour le gène de structure nitrate réductase ne peuvent pas réduire le chlorate en chlorite et sont, de ce fait, capables de pousser sur un milieu contenant du chlorate. Des mutants spontanés qui n'utilisent pas le nitrate sont sélectionnés sur un milieu à base de chlorate. Ces mutants "*nit*" présentent un mycélium ras et sans filament aérien lorsqu'ils sont cultivés sur un milieu dont la seule source d'azote est le nitrate (milieu minimum). La méthode d'identification consiste à confronter plusieurs mutants d'une souche avec les mutants de la souche de référence sur un milieu minimum. Deux souches sont dites végétativement compatibles lorsqu'elles forment un mycélium aérien dense, de type sauvage au point de rencontre des cultures de ces deux souches confrontées et placées l'une de l'autre à une distance de 2 cm.

3.2.4.2. Recherche des mutants résistants au chlorate ("*nit*")

Des explants mycéliens de 5 mm de diamètre sont prélevés de chaque isolat à partir de jeunes cultures fongiques (7 à 10 jours) se développant sur un milieu PDA. Quatre à cinq explants mycéliens de chaque isolat sont ensuite déposés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu minimum (= milieu MM) à base de chlorate (KPS) Les cultures sont ensuite incubées à l'obscurité et à une température de 22 à 28°C pendant 7 à 10 jours.

3.2.4.3. Caractérisation des mutants "*nit*"

Pour caractériser les mutants obtenus sur le milieu minimum à base de chlorate nous avons utilisé trois des cinq sources d'azote [nitrate (NaNO_3), nitrite (NaNO_2) et hypoxanthine (HPX)] citées par CORREL et al., (1987) (Tableau IV).

DESIGNATION DU MUTANT	CROISSANCE SUR DIFFERENTES SOURCES D'AZOTE		
	NaNO_3	NaNO_2	HPX
<i>Nit1</i>	- ¹	+ ²	+
<i>Nit3</i>	-	-	+
<i>NitM</i>	-	+	-
<i>Crun</i> ³	+	+	+

TABLEAU IV Caractérisation des mutants *nit* sur des milieux complémentés avec trois sources d'azote citées par CORRELL, et al., (1987)

1 - = Mycélium ras, sans filament aérien

2 + = Mycélium aérien épais et dense (type sauvage (mycélium))

3 *Crun* = mutant chlorate résistant capable d'utiliser les nitrates

Pour chaque mutant "*nit*" obtenu sur le milieu minimum à base de chlorate, on prélève, cote à cote sur le même secteur du même mutant "*nit*", trois explants mycéliens de 0,5 cm de diamètre. Chacun de ces explants mycéliens est déposé dans une boîte de Pétri contenant

comme source d'azote, soit le nitrate, soit le nitrite, soit l'hypoxanthine. Les cultures sont ensuite incubées à

l'obscurité et à une température comprise entre 22 à 28°C pendant 7 à 10 jours. Après cette période d'incubation, les mutants seront caractérisés sur la base de la morphologie de leur thalle sur les trois milieux en "nit1", "nit3" et "nitM". Les mutants qui présentent un thalle de type sauvage sur les trois milieux sont considérés comme des non mutants pour l'assimilation des nitrates (*crun*), et sont, de ce fait, éliminés. Les mutants "nitM" ont été utilisés dans les croisements car ils se complètent régulièrement avec les mutants "nit1" et "nit3".

3.2.4.4. Test de la compatibilité végétative

Pour le test de la compatibilité végétative, nous avons utilisé la souche S02-02-AD comme isolat de référence. L'identification de cette souche comme étant du *F.o.a.* a été confirmée par le test de pathogénicité réalisé en 2002 au laboratoire de l'INRA d'Adrar (BOUDEFFEUR 2010).

Tous les "nitM" obtenus à partir de l'isolat de référence S02-02-AD ont été utilisés dans le test de complémentation en face d'un "nit1" ou d'un "nit3" du même isolat sur le milieu MM (PUHALLA, 1985 ; CORREL et al., 1987). Pour la confrontation des mutants, on dépose dans une boîte de pétri contenant le milieu MM deux explants de 5 mm de diamètre prélevés à partir de mutants différents. Ces deux explants sont placés dans la boîte de Pétri à une distance de deux centimètres l'un de l'autre. Chacun de ces explants va donner naissance à un thalle rasant et sans mycélium aérien. Après 7 à 10 jours d'incubation, l'observation de la zone de rencontre des deux thalles permet de constater la compatibilité ou l'incompatibilité des mutants ainsi mis en confrontation. Les mutants "nitM" permettant de vérifier l'auto-compatibilité ont été retenus pour être utilisés comme testeur dans le test de la compatibilité végétative avec tous nos isolats. Les "nitM" testeurs sont mis en confrontation avec un "nit1" ou un "nit3" de différents isolats.

3.2.5. Caractérisation génétique par la RAPD

La RAPD consiste à réaliser une amplification de l'ADN avec une seule amorce oligonucléotidique de séquence aléatoire. En raison de sa petite taille, cette amorce peut s'hybrider à un grand nombre de sites complémentaires sur l'ADN cible, permettant ainsi d'obtenir l'amplification de plusieurs fragments d'ADN de taille différente. Ces derniers sont ensuite séparés par électrophorèse afin de révéler l'existence de profils électrophorétiques polymorphes.

3.2.5.1. Protocole d'extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN des 44 isolats a été réalisée par la technique de WEIGAN et al., (1993) modifié. Le protocole d'extraction de l'ADN comprend plusieurs étapes dont les plus importantes sont : la lyse cellulaire par le tampon de lyse CTAB (Cetyltrimethyl-Amonium Bromide), l'élimination des débris cellulaire, la dénaturation des protéines par le chloroforme-alcool isoamilique (24 : 1), la précipitation de l'ADN par le 2-propanol froid (-20 C°) sous forme d'une pelote. Celle-ci est lavée à l'aide d'un tampon de lavage puis dis-

soute dans un tampon de dissolution TE (Tris EDTA). La composition des tampons ainsi que le protocole d'extraction de l'ADN sont respectivement indiqués dans les annexes 3 et 4.

3.2.5.2 Visualisation de l'ADN

La visualisation de l'ADN a été réalisée sur un gel d'agarose à 0,6%. A cet effet, 0,36 g d'agarose ont été dissoutes dans 60 ml de TBE 1X (Tris Borate EDTA). La solution obtenue est placée dans un four à micro-ondes jusqu'à ébullition et dissolution complète de l'agarose. Par la suite, on ajoute à cette solution 2 µl de BET (Bromure d'éthydiuim). Le mélange ainsi obtenu est versé dans le support de gel d'une mini cuve d'électrophorèse Pharmacia LKB GNA 100. Le gel ainsi préparé a été laissé pendant 2 heures à la température ambiante. Après refroidissement, le gel a été plongé dans le TBE 1X contenu dans la mini cuve à électrophorèse. Les extraits d'ADN en solution dans le tampon de charge (8 µl d'ADN + 2 µl de tampon de charge) ont été déposés un à un dans les puits existant sur le gel, ce dernier a été soumis pendant 30 mn, à un champ électrique de 100 volts. La révélation des bandes d'ADN se fait sous lumière UV à l'aide d'un trans-illuminateur (Biotech-Fisher). Les tampons utilisés lors de l'électrophorèse sont indiqués dans l'Annexe 5. La qualité et la quantité d'ADN obtenus sont déterminées par un spectrophotomètre UV visible. (UNICAM), dont les détails, sont décrits en Annexe 6.

3.2.5.3. Analyse du polymorphisme des isolats par la RAPD

L'analyse génétique par RAPD a porté sur l'ADN de 40 Isolats de *F.o.a.* Sept amorces (Eurofins MWG Operon) dont les séquences ont été indiquées précédemment ont été utilisées. Pour l'amplification de l'ADN, un milieu réactionnel a été préparé dont la composition est indiquée dans l'Annexe 7.

– **Cycles thermiques de l'amplification d'ADN.** L'amplification de l'ADN a été réalisée dans un thermocycleur PTC 100 (Peltier Thermal Cycler) programmé de la manière suivante :

- une étape initiale de dénaturation de l'ADN à 94 C°, pendant 4 minutes, afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténares
- 45 cycles constitués de 3 étapes chacun : 1 mn à 94° C de dénaturation, 1,5 mn à 36 C° pour l'hybridation des amorces, 2 mn à 72° C pour l'élongation des fragments synthétisés.
- une étape finale de 15 mn à 72 C°

– **Électrophorèse des produits de la RAPD sur gel d'agarose.** Les produits de l'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,4% contenant du bromure d'éthydiuim. Pour cela 10 µl du produit d'amplification ont été déposés dans les puits du gel.

La migration a été effectuée à 100 volts pendant 3 heures dans du tampon TBE 1 X, et en présence d'un marqueur de poids moléculaire déposé dans les deux puits qui se trouve aux deux extrémités du gel. Pour l'observation des profils électrophorétique, le gel a été déposé dans un trans-illuminateur à UV.

– **Analyse des profils électrophorétiques.** Les tailles des bandes sont estimées par comparaison avec le marqueur de poids moléculaire (100 pb DNA Ladder). La présence ou l'absence de bandes dans les profils détermine des matrices qui ont été traitées avec le logiciel NTSYSpc V2.01. Il permet de définir un indice de dissimilarité en comparant les isolats 2 à 2 et aboutit à la construction de dendrogramme selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average) en utilisant l'indice de Nei. (1997).

4. RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Caractérisation morphologique des isolats de *F.o.a.* et de *F.o.*

Pour la caractérisation morphologique des 44 isolats de *F.o.a.* et de *F.o.*, nous avons tenu compte des critères suivants : caractères cultureux (aspect du mycélium et couleur des colonies) sur milieu de culture PDA, croissance mycélienne sur différents milieux de culture (PDA, Sabouraud, Malt) et sous différentes températures sur milieu PDA.

4.1.1. Caractères cultureux.

Au premier repiquage, tous les isolats ont exhibé, sur milieu PDA et sous une température d'incubation de 22° C, des colonies de couleur rose saumon, montrant un mycélium fin frisé (Fig. 5A). La couleur des colonies et l'aspect du mycélium obtenus dès le premier repiquage sont typiques de la forme sauvage de *F.o.a.* et sont conformes à ceux décrits par plusieurs auteurs (BULIT et al., 1967 ; CHETTAB et al., 1978 ; DJERBI, 1988 ; SEDRA, 2003 ; KADRI, 2008 ; BOUDEFFEUR, 2010).

Au bout du cinquième repiquage, les isolats ont montré une certaine variabilité quant à l'aspect du mycélium et la couleur des colonies (Tableau V). L'aspect du mycélium et la couleur des colonies permettent de classer les isolats en 4 groupes homogènes :

- Groupe 1. Colonies de couleur rose saumon, montrant un mycélium fin frisé (Fig. 5A) : S1-02-AD, S2-02-AD, S6-02-AD, S7-02-AD, S10-08-AD, S11-07-GH, S12-04-GH, S13-06-GH, S14-05-GH, S15-05-GH, S16-03-GH, S18-08-AD, S22-08-AD, S23-08-AD, S24-08-AD, S27-08-AD, S29-08-AD, S32-08-AD, S33-08-AD, S34-08-AD, S35-08-AD.
- Groupe 2. Colonies de couleur mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie, montrant un mycélium cotonneux, aérien et abondant, (Fig. 5B) : S3-02-AD, S4-02-AD, S5-02-AD, S8-02-AD, S9-02-AD, S17-08-AD, S19-08-AD, S20-08-AD, , S26-08-AD, S28-08-AD, S31-08-AD, S38-08-AD, S40-08-AD S41-08-AD.
- Groupe 3. Colonies de couleur blanche montrant un mycélium fin frisé, ramifié (Fig. 5C) : S36-08-AD, S37-08-AD, S39-08-AD, S43-08-AD, S44-08-AD.
- Groupe 4. Colonies de couleur beige, montrant un mycélium cotonneux, dense (Fig. 5D) : S21-08-AD, S25-08-AD, S30-08-AD, S42-08-AD.

Caractérisation morphologique et génétique de quelques isolats de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albiedinis* (Killian & Maire) W. L. Gordon, agent causal de la fusariose du palmier dattier.

ISOLATS	ASPECT DU MYCELIUM	COULEUR DES COLONIES
S01-02-AD	Fin et frisé	Rose saumon
S02-02-AD	Fin et frisé	Rose saumon
S03-02-AD	Cotonneux, aérien et abondant	Mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie
S04-02-AD	Cotonneux, aérien et abondant	Mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie
S05-02-AD	Cotonneux, aérien et abondant	Mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie
S06-02-AD	Fin et frisé	Rose saumon
S07-02-AD	Fin et frisé	Rose saumon
S08-02-AD	Cotonneux, aérien et abondant	Mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie
S09-02-AD	Cotonneux, aérien et abondant	Mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie
S10-08-AD	Fin et frisé	Rose saumon
S11-07-GH	Fin et frisé	Rose saumon
S12-04-GH	Fin et frisé	Rose saumon
S13-06-GH	Fin et frisé	Rose saumon
S14-06-GH	Fin et frisé	Rose saumon
S15-05-GH	Fin et frisé	Rose saumon
S16-03-GH	Fin et frisé	Rose saumon
S17-08-AD	Cotonneux, aérien et abondant	Mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie
S18-08-AD	Fin et frisé	Rose saumon
S19-08-AD	Cotonneux, aérien et abondant	Mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie
S20-08-AD	Cotonneux, aérien et abondant	Mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie
S21-08-AD	Cotonneux, dense	Beige
S22-08-AD	Fin et frisé	Rose saumon
S23-08-AD	Fin et frisé	Rose saumon
S24-08-AD	Fin et frisé	Rose saumon
S25-08-AD	Cotonneux, dense	Beige
S26-08-AD	Cotonneux, aérien et abondant	Mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie
S27-08-AD	Fin et frisé	Rose saumon
S28-08-AD	Cotonneux, aérien et abondant	Mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie
S29-08-AD	Fin et frisé	Rose saumon
S30-08-AD	Cotonneux, dense	Beige
S31-08-AD	Cotonneux, aérien et abondant	Mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie
S32-08-AD	Fin et frisé	Rose saumon
S33-08-AD	Fin et frisé	Rose saumon
S34-08-AD	Fin et frisé	Rose saumon
S35-08-AD	Fin et frisé	Rose saumon
S36-08-AD	Fin frisé ramifié	Blanche
S37-08-AD	Cotonneux, aérien et abondant	Mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie
S38-08-AD	Fin frisé ramifié	Blanche
S40-08-AD	Cotonneux, aérien et abondant	Mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie
S41-08-AD	Cotonneux, aérien et abondant	Mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie
S42-08-AD	Cotonneux, dense	Beige
S43-08-AD	Fin frisé ramifié	Blanche
S44-08-AD	Fin frisé ramifié	Blanche

TABLEAU V *Caractéristiques culturelles des isolats de F.o.a. et de F.o. sur milieu de culture PDA,*

Les 4 derniers isolats du tableau, représentent les isolats de *F.o.* provenant du sol.

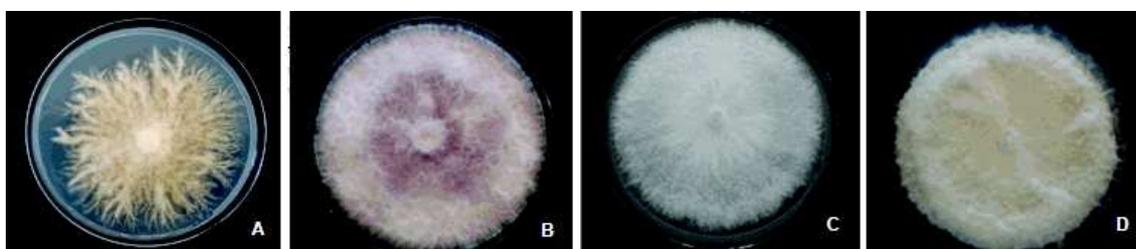


Figure 5 *Variabilité des caractères cultureux (aspect du mycélium et couleur des colonies) des isolats de F.o.a. et de F.o. sur milieu PDA.*

(A) : Colonies de couleur rose saumon, montrant un mycélium fin frisé.

(B) : Colonie de couleur mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie, montrant un mycélium cotonneux, aérien et abondant.

(C) : Colonies de couleur blanche montrant un mycélium fin frisé et ramifié.

(D) : Colonies de couleur beige, montrant un mycélium cotonneux et dense

La variabilité des caractères culturels a été constatée par plusieurs auteurs (BULIT et al., 1967 ; CHETTAB et al., 1978 ; BOUNAGA, 1985 ; DJERBI, 1988 ; SEDRA, 2003 ; KADRI, 2008) qui ont remarqué que les isolats fraîchement obtenus montrent des colonies de couleur rose saumon dont l'aspect du mycélium est fin frisé alors que ceux qui sont repiqués successivement exhibent une certaine variabilité des caractères culturels. (DJERBI et al., 1985 ; SEDRA et DJERBI, 1985) pensent que cette variabilité dans les caractères culturels serait due à des mutations.

4.1.2. Croissance mycélienne radiale sur différents milieux de culture

Les moyennes des croissances mycéliennes radiales journalières des 44 isolats de *F.o.a.* et de *F.o.* incubés à 22°C sur trois milieux de culture (PDA, Sabouraud, et Malt) sont indiquées dans le tableau VI.

Les moyennes des croissances mycéliennes radiales varient d'un milieu à l'autre. C'est ainsi que sur le milieu PDA, la vitesse moyenne maximale de la croissance mycélienne est de 19,86 mm/j (isolat S31-08-AD) alors que la vitesse moyenne minimale est de 11,36 mm/j (isolat S24-08-AD). Sur le milieu Sabouraud, la vitesse moyenne de la croissance mycélienne maximale est de 20,07 mm/j (isolat S33-08-AD) par contre la vitesse moyenne minimale est de 12,64 mm/j (isolat S21-08-AD). Sur le milieu Malt, la vitesse moyenne maximale de la croissance mycélienne est de 16,07 mm/j (isolat S34-08-AD) alors que la vitesse moyenne minimale est de 10,43 mm/j (isolat S25-08-AD).

D'une manière générale, la croissance radiale des isolats s'est montrée plus rapide sur le milieu PDA que sur les milieux Sabouraud et Malt. Ce dernier a montré la croissance mycélienne la plus lente. En effet, sur le milieu PDA, 31 isolats sur 44 ont exhibé une croissance mycélienne plus rapide que sur le milieu Sabouraud et 41 isolats sur les 44 ont montré une croissance plus rapide que sur le milieu Malt. En ce qui concerne le milieu Sabouraud, 43 isolats sur les 44 ont montré une croissance plus rapide que sur le milieu Malt.

L'analyse de la variance pour le paramètre croissance mycélienne radiale et journalière montre une différence très hautement significative pour le facteur milieu et une différence hautement significative pour le facteur isolat (Tableau VII).

Le test LSD à 95% réalisé sur la base de la moyenne de la croissance radiale journalière exprimée en mm/j sur les trois milieux des différents isolats nous a permis de classer les isolats en 20 groupes homogènes (Annexe 8, Tableau VIII).

Plusieurs auteurs ont constaté une variabilité dans la croissance mycélienne des isolats sur

Caractérisation morphologique et génétique de quelques isolats de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albiedinis* (Killian & Maire) W. L. Gordon, agent causal de la fusariose du palmier dattier.

ISOLATS	MILIEUX DE CULTURE		
	PDA	SABOURAUD	MALT
S01-02-AD	17.50	16.43	12.57
S02-02-AD	18.07	16.21	13.43
S03-02-AD	18.29	15.50	12.79
S04-02-AD	15.71	15.93	15.86
S05-02-AD	17.50	16.43	13.14
S06-02-AD	18.21	16.21	13.79
S07-02-AD	18.57	16.43	14.50
S08-02-AD	18.71	15.86	12.57
S09-02-AD	16.07	14.07	13.57
S10-08-AD	11.64	17.14	14.79
S11-07-GH	14.00	16.00	13.86
S12-04-GH	18.86	13.00	12.71
S13-06-GH	19.00	16.93	12.64
S14-06-GH	18.14	17.86	13.64
S15-06-GH	18.72	16.36	12.64
S16-03-GH	16.93	17.50	13.07
S17-08-AD	18.36	16.21	12.50
S18-08-AD	18.21	16.79	12.86
S19-08-AD	18.21	16.79	12.79
S20-08-AD	18.21	17.00	14.21
S21-08-AD	14.43	12.64	13.29
S22-08-AD	13.14	15.36	13.86
S23-08-AD	14.43	14.43	12.43
S24-08-AD	11.36	14.21	11.71
S25-08-AD	15.86	17.79	10.43
S26-08-AD	18.64	17.50	11.71
S27-08-AD	15.36	15.79	11.00
S28-08-AD	18.79	17.57	12.93
S29-08-AD	19.00	16.93	13.36
S30-08-AD	17.93	17.57	11.57
S31-08-AD	19.86	17.21	14.71
S32-08-AD	17.29	18.29	14.50
S33-08-AD	18.50	20.07	16.00
S34-08-AD	19.07	18.79	16.07
S35-08-AD	19.57	17.71	13.71
S36-08-AD	18.43	16.71	13.14
S37-08-AD	15.00	17.00	13.50
S38-08-AD	17.36	16.50	13.14
S39-08-AD	17.86	17.00	13.64
S40-08-AD	18.00	17.07	12.36
S41-08-AD	15.50	16.93	12.93
S42-08-AD	17.83	17.29	13.57
S43-08-AD	16.57	16.21	12.36
S44-08-AD	18.29	18.86	14.21

TABLEAU VI Moyennes de la croissance mycélienne radiale en mm/j au bout de 7 jours d'incubation à 22°C des isolats de *F.o.a.* et de *F.o.* sur trois milieux de culture (PDA, Sabouraud et Malt)

SOURCE DE VARIANCE	SCE	DDL	CARRE MOYEN	F	PROB	S
TOTAL VAR	719,363	131				
VAR FACTEUR A	398,577	2	199,289	111,03	0,0000	THS
VAR FACTEUR B	166,423	43	3,8703	2,16	0,0013	HS
VAR RESIDUELLE	154,363	86	1,79492			

TABLEAU VII Analyse de la variance pour les deux facteurs (isolats et milieux de culture : PDA, Sabouraud, Malt)

Facteurs : A = milieux, B = isolats

GROUPES HOMOGENES	ISOLATS
1	S24-08-AD
2	S21-08-AD
3	S23-08-AD
4	S22-08-AD
5	S27-08-AD
6	S10-08-AD, S9-02-AD
7	S11-07-GH, S25-08-AD
8	S12-04-GH
9	S43-08-AD
10	S41-08-AD, S37-08-AD, S1-08-AD, S3-02-AD
11	S38-08-AD, S5-02-AD, S30-08-AD, S17-08-AD, S8-02-AD
12	S40-08-AD, S16-03-GH, S4-02-AD, S15-05-GH, S2-02-AD, S19-08-AD
13	S26-08-AD, S18-08-AD
14	S6-02-AD, S36-08-AD, S39-08-AD, S13-06-AD,
15	S42-08-AD, S29-08-AD, S28-08-AD, S20-08-AD, S7-02-AD, S14-06-GH, S32-08-AD
16	S35-08-AD
17	S44-08-AD
18	S31-08-AD
19	S34-08-AD
20	S33-08-AD

TABLEAU VIII Groupes homogènes des isolats
sur les trois milieux de culture : PDA, Sabouraud, Malt

différents milieux de culture (SEDRA, 1993a ; SEDRA, 2003 ; KADRI, 2008).

4.1.3. Croissance mycélienne radiale sous différentes températures

Les moyennes de la croissance radiale journalière des 44 isolats incubés à différentes températures (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40°C) sur un milieu de culture PDA et à l'obscurité sont indiquées dans le tableau IX.

Pour tous les isolats, la croissance mycélienne est inhibée à 5 et 40°C. La température optimale de croissance mycélienne radiale se situe à 30°C pour la totalité des isolats. A cette température, la vitesse moyenne maximale de la croissance mycélienne est de 24,14 mm/j (isolat S01-02-AD) alors que la vitesse moyenne minimale est de 19,79 mm/j (isolat S41-08-AD).

L'analyse de la variance pour le paramètre croissance mycélienne montre une différence très hautement significative pour le facteur température et non significative pour le facteur isolat (Tableau X). En ce qui concerne les isolats, il ne semble pas y avoir une relation entre leur croissance mycélienne, leurs origines géographiques (Adrar ou Ghardaïa) et le substrat (sol, rachis) à partir duquel ils ont été isolés.

Le test LSD à 95% réalisé sur la base de la croissance mycélienne sous différentes températures (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40°C) permet de distinguer six groupes homogènes (Tableau XI) :

- Groupe A : Croissance mycélienne inhibée : températures 5°C et 40°C
- Groupe B : Croissance mycélienne lente : températures 10°C et 35°C
- Groupe C : Croissance mycélienne relativement rapide : température 15°C

- Groupe D : Croissance mycélienne moyennement rapide : température 20°C.
- Groupe E : Croissance mycélienne rapide : température 25°C.
- Groupe F : Croissance mycélienne optimale : température 30°C°

Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par plusieurs auteurs (BULIT et *al.*, 1967 ; BOUNAGA, 1985 ; DJERBI, 1988 ; SEDRA, 2003).

4.2. CARACTERISATION DES ISOLATS DE *F.O.A.* ET DE *F.O.* PAR LE TEST DE compatibilité végétative

Pour compléter la caractérisation des 44 souches de *F.o.a.* et de *F.o.*, un test de compatibilité végétative a été réalisé. La recherche des mutants "nit" a été effectuée pour tous les isolats sur le milieu sélectif KPS 15 additionnée de 15 g/l de KClO₃. L'isolat S02-02-AD a servi comme souche de référence. L'identification de cette souche comme étant de *F.o.a.* a été confirmée par un test de pathogénicité réalisé au laboratoire de l'INRA d'Adrar.

4. RESULTATS ET DISCUSSION

ISOLATS	TEMPÉRATURES							
	5C°	10C°	15C°	20C°	25C°	30C°	35C°	40C°
S01-02-AD	0,00	3,86	8,86	13,50	18,50	24,14	2,64	0,00
S02-02-AD	0,00	3,86	8,50	13,40	19,00	21,93	3,00	0,00
S03-02-AD	0,00	3,43	8,86	12,50	19,20	23,14	3,29	0,00
S04-02-AD	0,00	3,50	7,43	15,00	16,77	22,07	3,00	0,00
S05-02-AD	0,00	2,29	8,21	13,40	18,50	21,00	2,36	0,00
S06-02-AD	0,00	2,79	8,14	12,50	19,67	21,29	4,43	0,00
S07-02-AD	0,00	3,36	8,07	13,00	19,50	23,50	3,14	0,00
S08-02-AD	0,00	3,21	8,21	12,50	19,71	20,50	3,43	0,00
S09-02-AD	0,00	3,07	8,50	12,57	17,00	22,64	2,71	0,00
S10-08-AD	0,00	4,14	8,07	13,40	19,00	21,93	2,64	0,00
S11-07-GH	0,00	3,36	7,64	12,86	16,50	22,00	4,00	0,00
S12-04-GH	0,00	3,36	8,57	12,70	19,66	21,67	2,36	0,00
S13-06-GH	0,00	3,36	8,71	13,86	20,00	21,00	3,00	0,00
S14-06-GH	0,00	3,64	9,29	12,64	19,43	23,00	2,64	0,00
S15-05-GH	0,00	3,07	8,57	12,64	19,77	20,45	3,29	0,00
S16-03-GH	0,00	3,07	9,00	13,07	17,49	23,50	2,24	0,00
S17-08-AD	0,00	3,07	8,21	12,00	19,33	24,07	2,79	0,00
S18-08-AD	0,00	3,29	8,36	12,86	18,68	23,21	2,76	0,00
S19-08-AD	0,00	2,86	8,29	13,50	19,56	24,07	3,50	0,00
S20-08-AD	0,00	3,14	8,93	14,00	19,35	20,86	3,21	0,00
S21-08-AD	0,00	2,86	7,07	13,29	17,65	23,00	3,00	0,00
S22-08-AD	0,00	3,21	7,21	12,86	15,50	21,00	2,21	0,00
S23-08-AD	0,00	3,07	7,93	13,43	16,78	22,56	3,00	0,00
S24-08-AD	0,00	3,29	7,36	12,00	17,57	22,43	3,29	0,00
S25-08-AD	0,00	3,86	9,21	11,40	16,63	23,35	3,14	0,00
S26-08-AD	0,00	3,00	8,86	11,50	19,00	23,65	3,43	0,00
S27-08-AD	0,00	3,14	8,43	12,50	17,36	21,00	2,71	0,00
S28-08-AD	0,00	3,29	7,64	12,73	19,87	22,00	3,07	0,00
S29-08-AD	0,00	2,86	8,86	13,00	20,10	24,00	3,21	0,00
S30-08-AD	0,00	3,79	9,36	11,50	18,73	21,45	3,00	0,00
S31-08-AD	0,00	3,93	7,93	13,50	20,00	23,34	3,14	0,00
S32-08-AD	0,00	2,79	9,36	12,50	18,54	22,36	3,21	0,00
S33-08-AD	0,00	3,07	7,36	13,76	19,53	20,00	2,57	0,00
S34-08-AD	0,00	3,71	9,43	11,00	19,93	22,46	3,14	0,00
S35-08-AD	0,00	3,29	8,86	12,70	20,50	23,00	2,86	0,00
S36-08-AD	0,00	2,86	8,57	13,00	19,54	23,67	2,50	0,00
S37-08-AD	0,00	3,07	8,50	12,50	16,50	24,00	3,86	0,00
S38-08-AD	0,00	3,07	7,79	11,14	18,69	22,32	2,64	0,00
S39-08-AD	0,00	2,93	8,14	12,64	19,00	21,14	3,00	0,00
S40-08-AD	0,00	3,36	8,14	11,00	18,87	22,71	3,29	0,00
S41-08-AD	0,00	3,00	7,71	13,50	16,00	19,79	3,50	0,00
S42-08-AD	0,00	3,50	9,29	13,57	18,50	20,43	3,07	0,00
S43-08-AD	0,00	1,86	6,50	13,50	17,88	22,14	7,21	0,00
S44-08-AD	0,00	3,21	9,29	14,00	19,27	21,71	3,07	0,00

TABLEAU IX Moyennes de la croissance mycélienne radiale exprimée en mm/j des isolats incubés à différentes températures (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40°C) sur milieu PDA.

SOURCE DE VARIANCE	SCE	DDL	CARRE MOYEN	F	PROB	S
TOTAL VAR	22719,0	351				
VAR FACTEUR A	22503,1	7	3214,73	5087,42	0,0000	THS
VAR FACTEUR B	25,7112	43	0,597935	0,95	0,5713	NS
VAR RESIDUELLE	190,201	301	0,631897			

TABLEAU X Analyse de la variance pour les deux facteurs (isolats et différentes températures)

Facteurs : A = températures, B = isolats

TEMPERATURES	GROUPES HOMOGENES
5	A
40	A
35	B
10	B
15	C
20	D
25	E
30	F

TABLEAU XI Classement selon le test LSD à 95% de la croissance radiale journalière exprimée en mm/j par rapport aux différentes températures

4.2.1. Isolement des mutants “nit”

Les cultures réalisées sur le milieu KPS 15 ont donné naissance à des colonies minces, rasantes et à croissance restreinte. A la périphérie de ces dernières, on constate la présence de secteurs mycéliens résistants au chlorate (mutants “nit”) (Fig. 6 A). Sur les 440 explants déposés dans les boîtes de Pétri contenant le milieu KPS 15, nous avons obtenu 350 secteurs résistants au chlorate. Le nombre de ces secteurs varie d’un isolat à l’autre. Les apex d’hyphes prélevés au niveau de ces secteurs et repiqués sur milieu minimal MM ont développé des colonies minces, fines, à croissance rapide.

4.2.2. Caractérisation des mutants “nit”

La caractérisation des différents types de mutants a été réalisée sur le milieu minimal sélectif MM additionné de différentes sources d’azote : nitrate (NaNO_3), nitrite (NaNO_2) et hypoxanthine (HPX). Différents types de mutants : “nit1”, “nit3”, “nitM” et des “*crun*” (Chlorate Résistant capable d’Utiliser les Nitrates), ont été caractérisés sur la base de la morphologie de leur mycélium sur les trois milieux sélectifs MM additionnés de différentes sources d’azote. Les souches “*crun*” sont éliminées car elles ne forment pas d’hétérocaryons sur le milieu MM (LESLIE, 2006). Les résultats de la caractérisation des 350 mutants chlorates résistants sont indiqués dans le tableau XII. Les pourcentages des différents types de mutants sont variables : 43,71% d’entre eux sont des “nit1”, 7,43% sont des “nit3”, 30,28% sont des “nitM” et 18,57% sont des “*crun*” (Tableau XII)

4.2.3. Confrontation des mutants

La confrontation a été réalisée par les “nitM” testeurs obtenus à partir de l’isolat de référence S2-02-AD sur les 44 isolats dont 40 ont été obtenus à partir de rachis de palmier dattier et 4 à partir du sol de palmeraie. Une confrontation des “nitM” testeurs a été également réalisée avec les “nit1” et les “nit3” obtenus à partir de l’isolat de référence S2-02-AD. Deux isolats sont végétativement compatibles, lorsque, sur milieu minimal, leurs mutants forment au niveau de la zone de confrontation un mycélium abondant qui suggère la formation d’un hétérocaryon (Fig. 6B). Ces deux isolats sont alors considérés comme appartenant au même groupe de compatibilité végétative ou VCG (= “Végétative Compatibility Group”). Par contre, deux isolats sont dits végétativement incompatibles, lorsqu’il n’y a pas formation sur

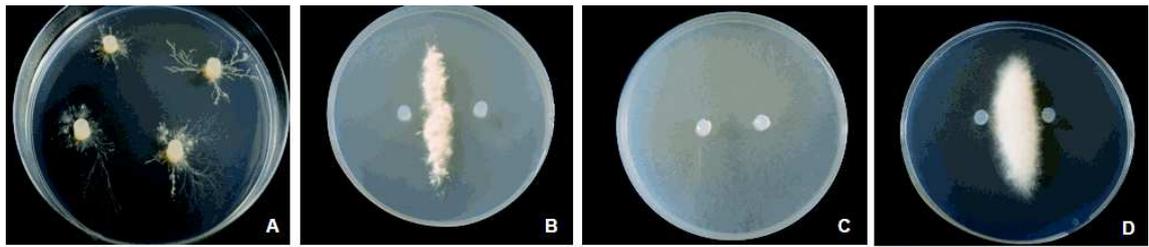
milieu minimal MM d'un mycélium hétérocaryotique au niveau de la zone de rencontre des hyphes des deux souches testées (Fig. 6C).

4.2.3.1. Confrontation des "nitM" de l'isolat de référence S2-02-AD avec les "nit1" et les "nit3"

La confrontation d'un "nitM" avec le "nit1", ou le "nit3" sur le milieu minimal MM, a donné naissance après deux à trois jours à des thalles rasants et sans mycélium aérien. Après 7 à 10 jours, on observe au niveau de la zone de rencontre des deux thalles, un mycélium aérien, dense et épais correspondant à la formation d'un hétérocaryon (Fig. 6D). Ceci nous a permis de vérifier l'auto-compatibilité des mutants de l'isolat de référence (LESLIE, 2006). Les "nitM" auto-compati-

ISOLATS	TYPES DE MUTANTS				
	NBR. DE MUTANTS	"nit1"	"nit3"	"nitM"	"cru"
S1-02-AD	08	04	01	01	02
S2-02-AD	07	01	01	05	00
S3-02-AD	10	03	01	02	04
S4-02-AD	06	02	00	03	01
S5-02-AD	10	04	00	03	03
S6-02-AD	10	03	01	01	05
S7-02-AD	10	04	02	02	02
S8-02-AD	10	03	01	04	02
S9-02-AD	10	04	00	03	03
S10-08-AD	10	05	01	02	02
S11-07-GH	09	03	00	04	02
S12-04-GH	05	03	00	02	00
S13-06-GH	10	04	01	03	02
S14-06-GH	06	03	00	02	01
S15-05-GH	05	02	00	03	00
S16-03-GH	03	02	00	00	01
S17-08-AD	07	03	01	03	00
S18-08-AD	09	03	00	05	01
S19-08-AD	07	04	01	02	00
S20-08-AD	10	06	00	02	02
S21-08-AD	07	02	00	03	02
S22-08-AD	04	03	00	01	00
S23-08-AD	10	04	00	01	05
S24-08-AD	04	02	01	00	01
S25-08-AD	10	05	01	03	01
S26-08-AD	04	03	00	01	00
S27-08-AD	10	04	01	03	02
S28-08-AD	10	05	02	03	00
S29-08-AD	10	04	00	04	02
S30-08-AD	09	04	01	03	01
S31-08-AD	08	03	01	03	01
S32-08-AD	10	04	01	03	02
S33-08-AD	08	05	00	03	00
S34-08-AD	07	03	00	03	01
S35-08-AD	10	05	01	03	01
S36-08-AD	08	03	00	02	03
S37-08-AD	10	06	00	02	02
S38-08-AD	09	03	02	03	01
S39-08-AD	10	07	00	01	02
S40-08-AD	07	01	00	04	02
S41-08-AD	09	04	02	03	00
S42-08-AD	04	02	00	00	02
S43-08-AD	01	00	01	00	00
S44-08-AD	09	05	01	02	01
POURCENTAGES	100%	43,71%	7,43%	30,28%	18,57%

TABLEAU XII Nombre et Pourcentage des mutants des 44 isolats de *F.o.a.* et de *F.o.* résistants au chlorate



PHOTOS: CHIHAT, Laboratoire mycologie (ENSA)

Figure 6 Test de compatibilité végétative.

(A). Mutant "nit" montrant des secteurs mycéliens résistants au chlorate.

(B). Mutants montrant au niveau de la zone de confrontation un mycélium abondant indiquant la formation d'un hétérocaryon.

(C). Deux isolats végétativement incompatibles ne formant pas au niveau de la zone de rencontre un mycélium hétérocaryotique.

(D). Confrontation d'un "nitM" avec le "nit1", ou le "nit3" appartenant à un même isolat (auto confrontation) et donnant un mycélium aérien, dense et épais correspondant à la formation d'un hétérocaryon

compatibles sont utilisés comme testeurs pour tous les autres isolats.

4.2.3.2. Confrontation des "nitM" testeurs avec les "nit1" ou les "nit3" des isolats de *F.o.a.* obtenus à partir de rachis

La confrontation sur le milieu minimal MM des "nitM" testeurs avec les "nit1" ou les "nit3" des isolats obtenus à partir de rachis a donné naissance au niveau de la zone de rencontre des deux thalles un mycélium aérien dense et épais correspondant à la formation d'un hétérocaryon (Fig. 6B). Ceci indique que les 40 isolats issus de rachis appartiennent au même groupe de compatibilité végétative.

4.2.3.3. Confrontation des "nitM" testeurs avec les "nit1" ou les "nit3" des isolats de *F.o.* obtenus à partir du sol

La confrontation sur milieu minimale des "nitM" testeurs avec les "nit1" ou les "nit3" des 4 isolats obtenus à partir du sol a donné naissance à des thalles rasants et sans mycélium aérien. Après 7 à 10 jours, on a remarqué que les thalles restent ras et sans mycélium aérien même au niveau de la zone de confrontation (Fig. 6C). Ceci indique que les 4 isolats obtenus à partir d'échantillons de sol de palmeraie n'appartiennent pas au même groupe de compatibilité végétative des isolats obtenus à partir de rachis.

Les 40 isolats des wilayat d'Adrar et de Ghardaïa isolés à partir du rachis peuvent être classés dans un même groupe de compatibilité végétative et appartiennent à la forme spéciale *albedinis* de l'espèce *Fusarium oxysporum* Schltdl. (TANTAOUI et BOISSON, 1991). Par contre, les isolats isolés à partir d'échantillons de sol de palmeraie semblent être des formes saprophytes de *F.o.* Celles-ci ne peuvent pas être classées dans le groupe précédent de compatibilité végétative car ils ne forment pas d'hétérocaryons avec l'isolat de référence. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par d'autres auteurs (OUINTEN, 1991, TANTAOUI et *al.*, 1996 ; OUINTEN, 1996,)

4.3. Caractérisation genetique DES ISOLATS DE *F.O.A.* PAR LA RAPD

Afin de tester le polymorphisme des 7 amorces (OPF01, OPF04, OPF5, OPF06, OPF08, OPF12 et OPF13), un test d'amplification préliminaire de l'ADN de deux isolats de *F.o.a.*, choisis arbitrairement, l'un de la région de Ghardaïa (S11-07-GH) et l'autre celui d'Adrar (S2-02-AD). Toutes les amorces testées ont permis l'amplification de l'ADN des deux isolats choisis arbitrairement (Fig. 7). Ces amorces ont été retenues pour l'étude du polymorphisme de l'ADN des isolats du *F.o.a.* par la RAPD.

4.3.1. Etude du polymorphisme de l'ADN des isolats de *F.o.a.* par la RAPD

Le résultat de l'amplification de l'ADN des 40 isolats de *F.o.a.* avec les 7 amorces a montré que OPF5, OPF08 et OPF12 ont amplifiés des fragments non polymorphes, OPF04 et OPF013 ont montré un faible polymorphisme et OPF01 et OPF06 ont donné des profils non interprétables vu la diffi-

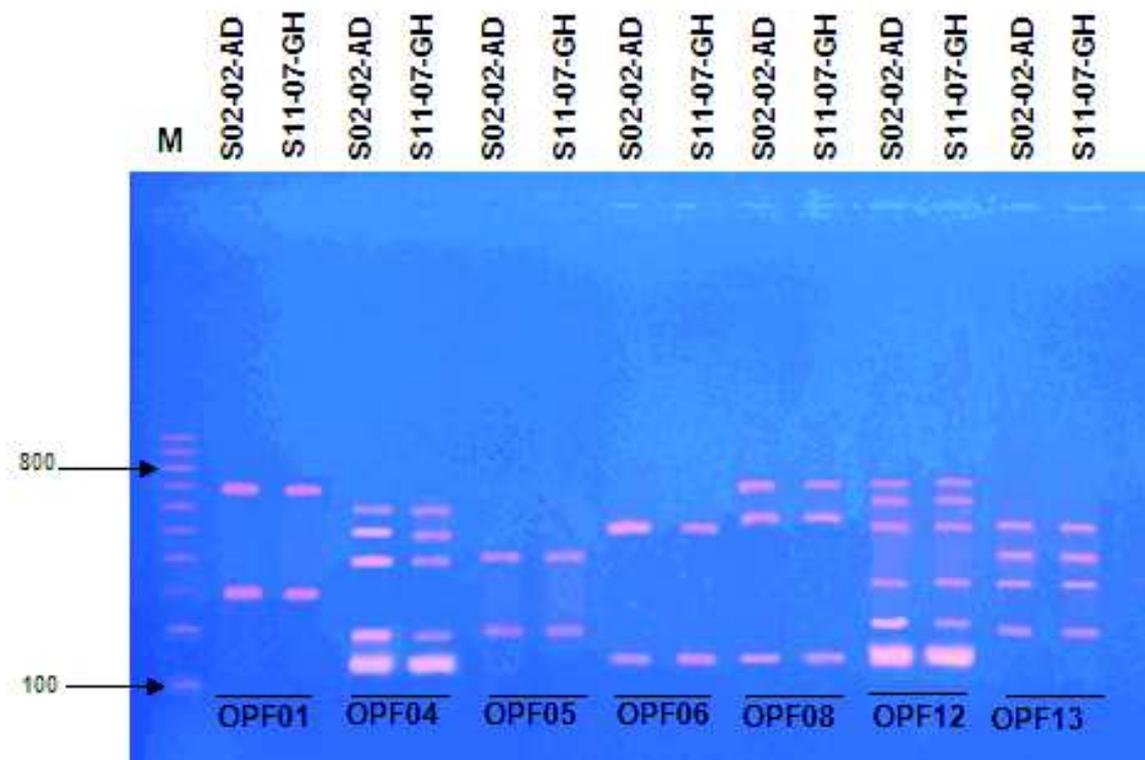


Figure 7 Essai d'amplification de l'ADN de deux isolats de *F.o.a.* (S11-07-GH et S2-02-AD) avec les 7 amorces nucléotidiques : OPF01, OPF04, OPF05, OPF06, OPF08, OPF12 et OPF13. M = marqueur moléculaire.

culté de visualiser les bandes de l'ADN de certains isolats. Les amorces OPF04 et OPF013 ont été utilisés pour étudier le polymorphisme de l'ADN des 40 isolats de *F.o.a.*

4.3.1.1. L'amplification de l'ADN des isolats de *F.o.a.* avec l'amorce OPF04

Cette amorce a permis l'amplification de 7 bandes de poids moléculaire allant de 150 pb à 600 pb. Trois profils distincts ont été révélés (Fig. 8). La différence entre ces trois profils réside dans l'absence de la bande de 600 pb chez les deux isolats S21-08-AD et S25-08-AD et la présence de deux bandes supplémentaires de 300 pb et 350 pb chez les trois isolats S10-02-AD, S17-08-AD et S38-08-AD. Selon la présence ou l'absence des bandes sur les profils électrophorétiques une matrice a été réalisée. Celle-ci a été traitée par le logiciel NTSYSpc V2.01 afin d'obtenir un dendrogramme qui a indiqué un faible polymorphisme entre les isolats de *F.o.a.* (Fig. 9) et qui a séparé les isolats, selon un seuil de similitude de 83 %, en deux groupes. Le premier groupe comporte 35 isolats provenant des régions d'Adrar et de Ghardaïa et le second regroupe 5 isolats originaires uniquement de la région d'Adrar.

4.3.1.2. L'amplification avec l'amorce OPF13.

Cette amorce a permis l'amplification de 6 bandes de poids moléculaire allant de 200 pb à 700 pb. Quatre profils distincts ont été révélés (Fig. 10). La différence entre ces quatre profils réside dans la présence de quatre bandes de 200,300, 400 et 500 pb chez 33 isolats, l'absence de la bande de 500 pb. chez deux isolats S04-02-AD et S08-02-AD, la présence d'une bande supplémentaire de 600 pb chez quatre isolats S17-08-AD, S19-08-AD, S39-08-AD et S40-08-AD et la présence de deux bandes supplémentaires de 600 et 700 pb chez l'isolat S20-08-AD. Selon la présence ou l'absence des bandes sur les profils électrophorétiques une matrice a été réalisée. Celle-ci a été traitée par le logiciel NTSYSpc V2.01 afin d'obtenir un dendrogramme qui a indiqué un faible polymorphisme entre les isolats de *F.o.a.* (Fig. 11) et qui a séparé les isolats, selon un seuil de similitude de 84 %, en deux groupes. Le premier groupe comporte 33 isolats provenant des régions d'Adrar et de Ghardaïa et le deuxième regroupe 7 isolats originaires uniquement de la région d'Adrar.

La caractérisation des isolats de *F.o.a.* par la RAPD a révélé un faible polymorphisme avec les deux amorces OPF04 et OPF13. Le dendrogramme obtenu avec l'amorce OPF04 montre deux groupes d'isolats à un seuil supérieur à 80% de similitude. Ceci indique que les isolats sont génétiquement très proches. Les isolats du premier groupe qui sont originaire d'Adrar et de Ghardaïa montrent un même profil électrophorétique. Par contre, les isolats du deuxième groupe (S21-08-AD, S25-08-AD, S10-02-AD, S17-08-AD et S38-08-AD) qui ont montré un faible polymorphisme sont tous originaires d'Adrar. Le dendrogramme obtenu avec l'amorce OPF13 montre également deux groupes d'isolats à un seuil supérieur à 80% de similitude. Ceci indique que les isolats sont

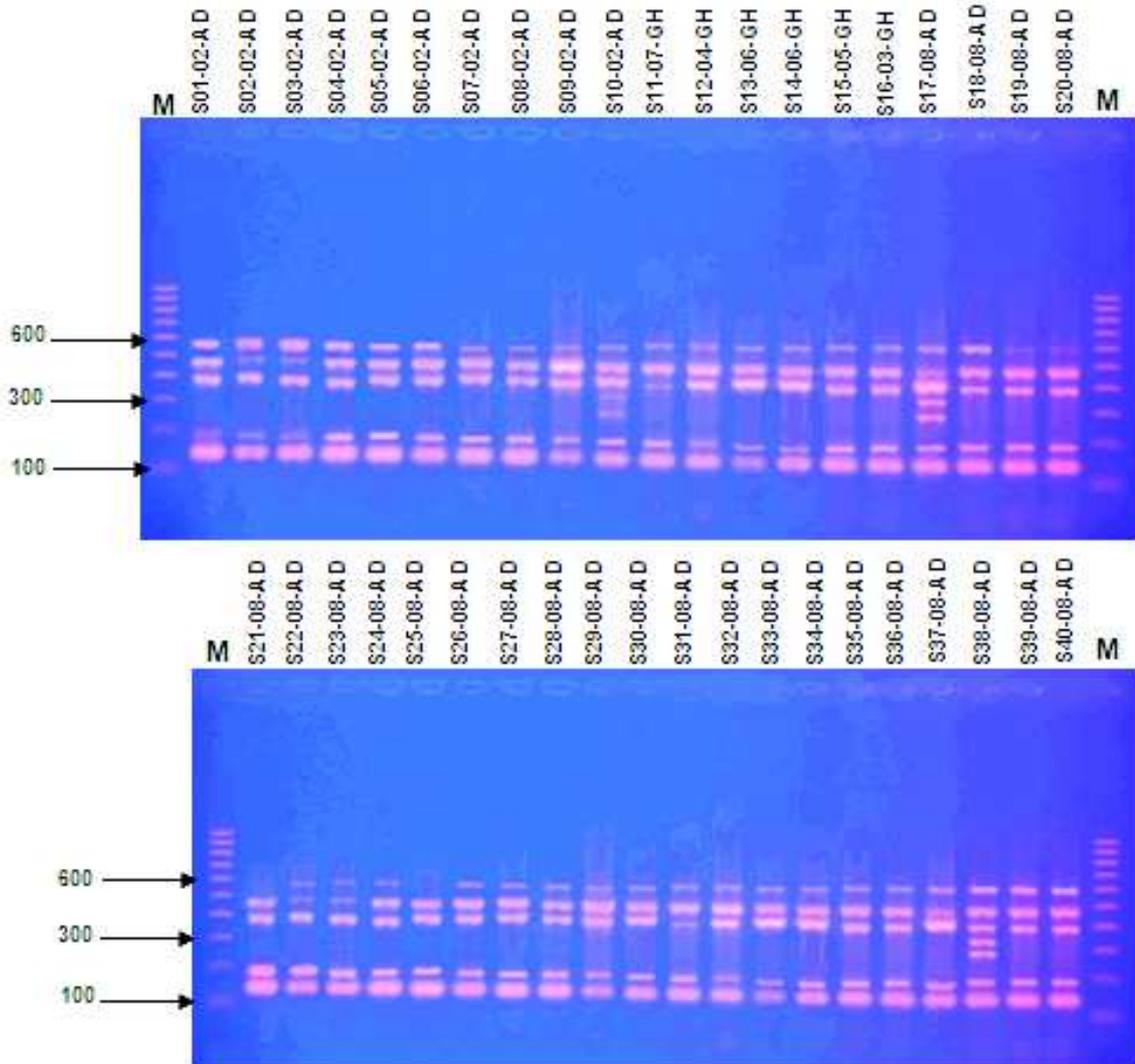


Figure 8 Profils d'amplification révélés par l'amorce OPF04 des 40 isolats de *F.o.a.* (M = marqueur moléculaire)

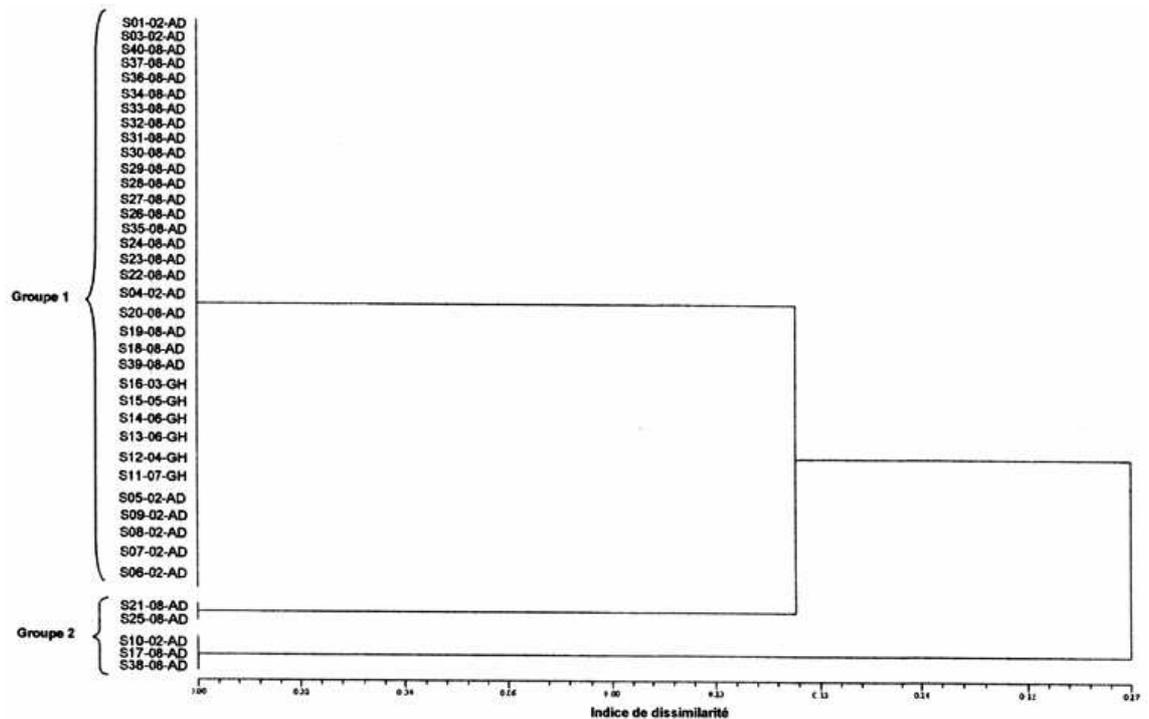


Figure 9 dendrogramme des isolats de *F.o.a* obtenu avec l'amorce OPF04

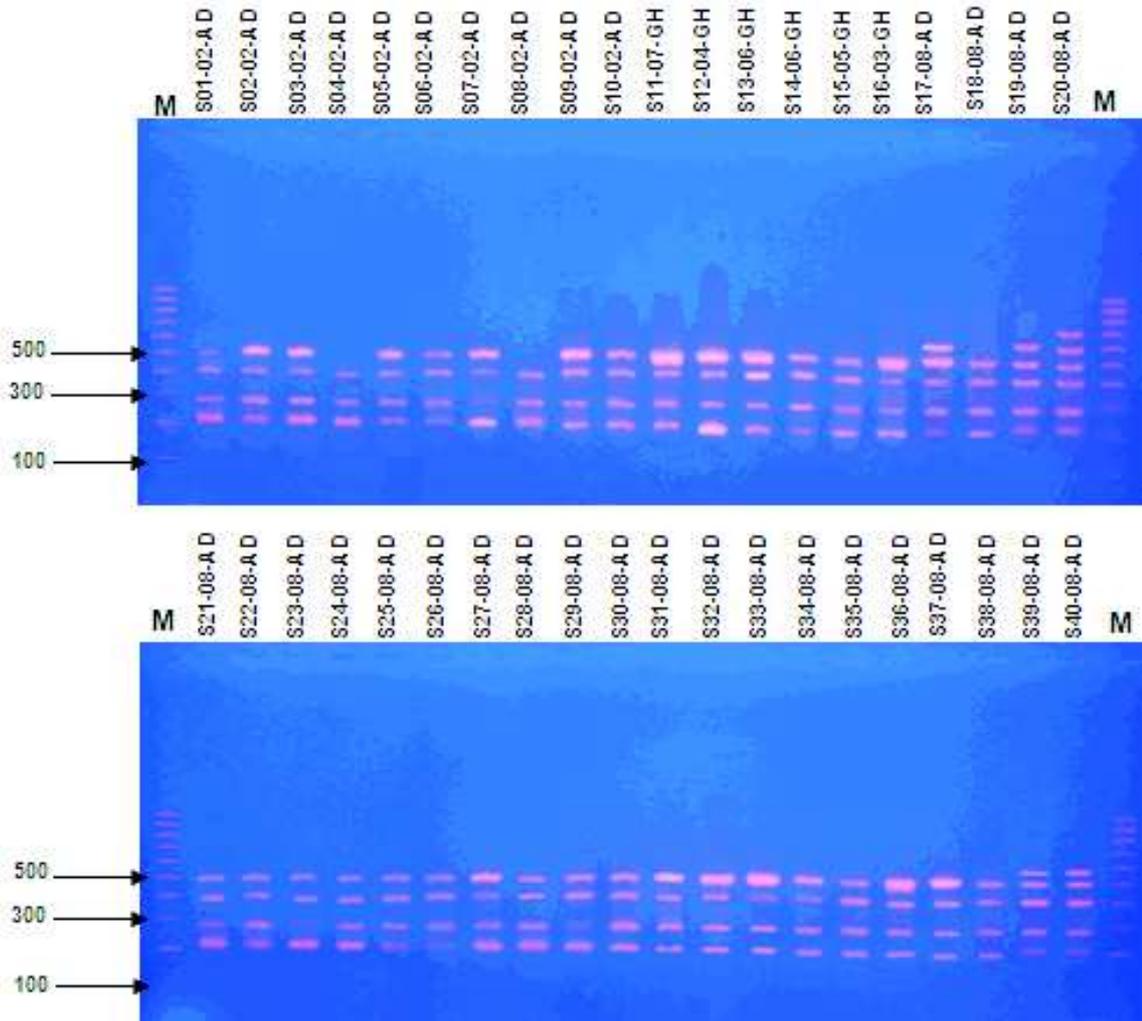


Figure 10 Profils d'amplification obtenus avec l'amorce OPF13 des 40 isolats de *F.o.a.* (M = marqueur moléculaire)

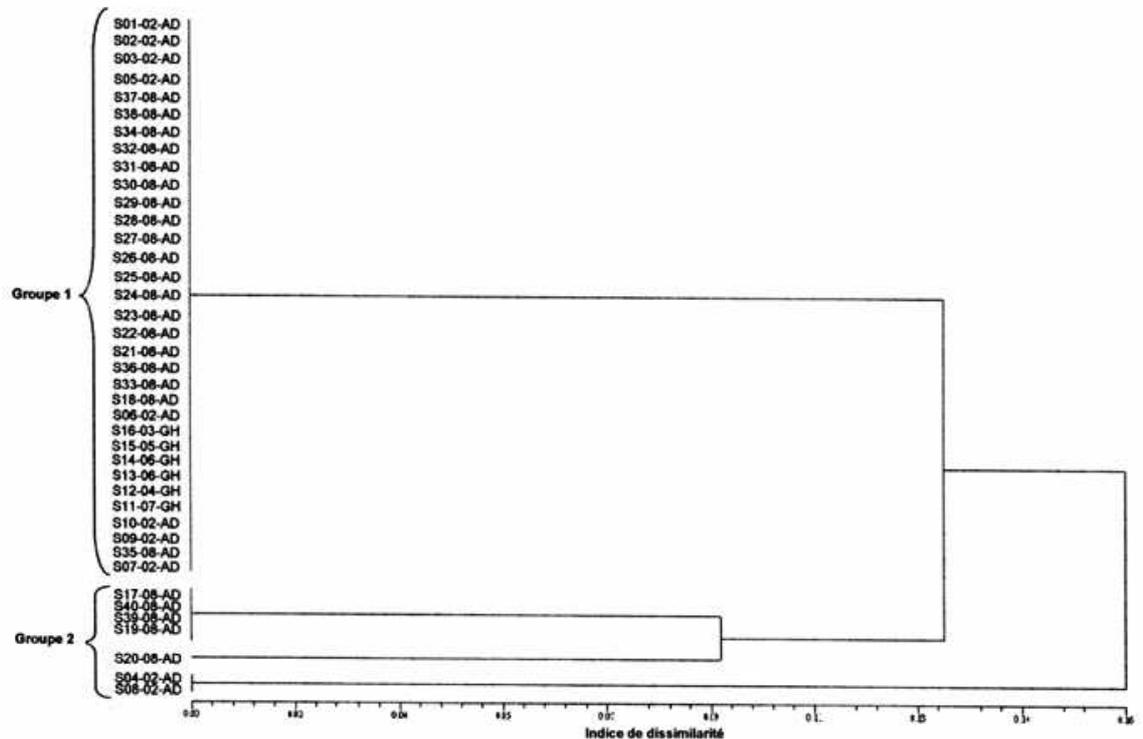


Figure 11 dendrogramme des isolats de *F.o.a* obtenu avec l'amorce OPF13

génétiquement très proches. Les isolats du premier groupe qui sont originaires des régions d'Adrar et de Ghardaïa montrent un même profil électrophorétique. Par contre, les isolats du deuxième groupe (S04-02-AD, S08-02-AD, S17-08-AD, S19-08-AD, S39-08-AD, S40-08-AD et S20-08-AD) qui ont montré un faible polymorphisme sont tous originaires de la région d'Adrar. Ce faible polymorphisme a été remarqué aussi par OUINTEN (1996) qui a utilisé les mêmes amorces sur des isolats de *F.o.a.* provenant des palmeraies Algériennes.

5. conclusion

Le palmier dattier joue un rôle très important sur le plan économique et sur le plan social au niveau des zones arides et semi-arides du globe. Il est attaqué par plusieurs agents pathogènes qui entraînent souvent des pertes considérables. La fusariose vasculaire du palmier causée par le *F.o.a.* constitue au Maroc et dans le sud Ouest Algérien, l'une des maladies la plus destructive et la plus menaçante. Différents travaux ont été consacrés au *F.o.a.* en vue de trouver des solutions permettant une méthode de lutte efficace à l'égard de ce champignon. La caractérisation morphologique et génétique des populations de *F.o.a.* provenant de plusieurs palmeraies Algériennes et Marocaines a également fait l'objet de plusieurs travaux de recherches.

Dans le présent travail, nous avons essayé de caractériser morphologiquement (aspect du mycélium, couleur des colonies, croissance mycélienne sur trois milieux de culture et également à différentes températures sur milieu PDA) et génétiquement (compatibilité végétative et RAPD) 44 isolats dont 40 de *F.o.a.* et 4 de *F.o.* provenant de palmeraies des wilayates d'Adrar et de Ghardaïa. Sur le milieu PDA, tous les isolats ont montré au premier repiquage des colonies de couleur rose saumon avec un mycélium fin frisé, montrant ainsi une très grande homogénéité entre les isolats. Au bout du cinquième repiquage les isolats ont exhibé trois aspects du mycélium : (1) aérien, cotonneux et abondant, (2) fin frisé ramifié et (3) cotonneux et dense. Les isolats ont également montré au bout du cinquième repiquage trois colorations des colonies : (1) mauve foncé au centre et mauve clair à la périphérie, (2) blanche et (3) beige. Cette variabilité dans l'aspect du mycélium et la coloration des colonies est peut être due soit à des mutations (DJERBI et *al.* 1984 ; SEDRA et DJERBI, 1984), soit aux conditions de culture et plus particulièrement la lumière.

La croissance mycélienne radiale des isolats sur trois milieux de culture s'est montré rapide sur le milieu PDA suivi par les milieux Sabouraud et Malt. En effet sur le milieu PDA, 31 isolats sur les 44 ont exhibé une croissance mycélienne plus rapide que celui de Sabouraud et 41 isolats sur les 44 ont montré une croissance plus rapide par rapport au milieu Malt. En ce qui concerne le milieu Sabouraud, 43 isolats sur les 44 ont montré une croissance plus rapide que sur le milieu Malt. La croissance mycélienne radiale sous différentes températures (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40°C) a montré une inhibition de cette dernière à 5 et 40°C pour la totalité des isolats. La température optimale de croissance mycélienne radiale se situe à 30°C pour la totalité des isolats. A cette température, la vitesse moyenne maximale de la croissance mycélienne est de 24,14 mm/j (isolat S01-02-AD) alors que la vitesse moyenne minimale est de 19,79 mm/j (isolat

S41-08-AD). Pour chaque température, la croissance mycélienne radiale semblent être identique pour tous les isolats et quelque soit l'origine géographique (Adrar ou Ghardaïa) et le substrat (sol ou rachis) à partir duquel ils ont été isolés.

La technique de la compatibilité végétative a montré que les 40 isolats des wilayates d'Adrar et de Ghardaïa isolés à partir du rachis appartiennent à un même groupe de compatibilité. Par contre, les isolats obtenus à partir d'échantillons de sol de palmeraie et qui semblent être des formes saprophytes de *F.o.* appartiennent à un autre groupe de compatibilité végétatives. La technique de la RAPD avec les amorces OPF5, OPF08 et OPF12 n'ont montré aucun polymorphisme. L'amplification des isolats de *F.o.a.* avec les

amorces OPF04 et OPF013 a montré un faible polymorphisme et ont permis d'amplifier respectivement 7 bandes (de poids moléculaire compris entre 150 pb à 600 pb) et 6 bandes (de poids moléculaire compris entre 200 pb à 700 pb). L'analyse des dendrogrammes obtenus avec ces deux amorces a montré que les isolats sont génétiquement très proches.

L'étude de la caractérisation des isolats de *F.o.a.* par des critères morphologiques, par la compatibilité végétative et la RAPD doit être complétée par l'utilisation d'autres marqueurs moléculaires comme (AFLP, VNTR, SSR) sur une gamme d'échantillons plus large provenant de différentes palmeraies algériennes très distantes les unes des autres afin d'évaluer la diversité génétique de *F.o.a.* en Algérie. Parallèlement à cela, il serait intéressant d'étudier la relation hôte pathogène afin de faire une comparaison entre la structure génétique de l'agent pathogène et celle de la plante hôte. Ceci permettra d'élucider la dynamique de l'interaction hôte-pathogène et de mettre en place de une stratégie de lutte efficace contre le bayoud.

6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABED, F., D. YATTA, H. KHELLAFI, M. S. YAKHOU, B. AMARA et L. DJELLAL. 2006. Optimisation de la technique d'obtention de suspension cellulaire et de protoplastes en vue d'une hybridation somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Conférence Régionale «Mutagenèse induite et biotechnologies d'appui pour la protection du palmier dattier contre le bayoud». Alger. Ed. INRAA.
- AMIR, H., M. BENNACEUR, Z. LOUTFI, A. AMIR et N. BOUNAGA. 1985. Le palmier dattier et la fusariose. XIII. Contribution à l'étude de l'écologie microbienne du sol de deux palmeraies atteintes de bayoud. *Rev. Ecol. Biol. Sol* 22 : 313-330.
- AMIR, H. et A. AMIR. 1988. Le palmier dattier et la fusariose. XIV. Antagonisme dans le sol de souches de *Fusarium solani* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. *Rev. Ecol. Biol. Sol* 25 : 57-74.
- BELGUEDJ, M. 2009. Le marché des dattes. Atelier National sur la phoeniciculture. INRAA, Alger 6p.
- BENZAZA, H. B., P. BROCHARD, D. DUBOST et P. HETHENER. 1970. Progression du Bayoud en Algérie et résultats des prospections entreprises. Travaux sur le Bayoud, Congrès Maghrébin d'Agronomie Saharienne
- BESSEDIK, F., S. AMRANI et B. MOUSSAOUI. 2006. Dénombrement de la microflore des sols des palmeraies Algériennes, isolement et caractérisation de bactéries antagonistes au *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Cas de deux palmeraies à In Salah. Conférence Régionale «Mutagenèse induite et biotechnologies d'appui pour la protection du palmier dattier contre le bayoud». Alger. Ed. INRAA.
- BOTES, A. et J. B. EMMENS. 2000. Date palm production and trade statistics. Proceedings of the date palm international symposium, Windhek, Namibia, 265-270.
- BOTES, A. et A. ZAID. 2002. The economic importance of date production and international trade. In : *Date palm cultivation*. Eds. A Zaid et FAO plant production and protection. Rome : Food and Agriculture Organisation of the United Nations.
- BOUDEFFEUR, S. 2010. Etude histologique de la pénétration de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (HANSEN et SNYDER) GORDON à travers les racines de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Mémoire de Magister en Sciences Agronomiques. ENSA. El-Harrach, 87p.
- BOUGUEDOURA, N. 1979. Contribution à la connaissance du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) étude des productions axillaires. Thèse de doctorat 3^{ème} cycle (USTHB). Alger.
- BOUGUEDOURA, N., N. MICHAUX-FERRIERE et J.L. BOMPAR. 1990. Comportement in vitro de bourgeons axillaires de type indéterminé du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). *Can. J. Bot.* 68 : 2004-2009.

- BOUGUEDOURA, N. 1991. Connaissance de la morphogenèse du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Etude *in situ* et *in vitro* du développement morphogénétique des appareils végétatif et reproducteur, Thèse de doctorat, Université des Sciences et de la technologie Houari Boumediene. Alger.
- BOUNAGA, N. 1975. Germination de microconidies et macroconidies de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Bull. Sos. Hist. Afr. Nord* 66 : 39-44.
- BOUNAGA, N. 1985. Contribution à l'étude de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (KILLIAN et MAIRE) GORDON, agent de la fusariose du palmier dattier. Thèse de doctorat en Science naturelles. Université Houari Boumediene, Alger, 195p.
- BROCHARD, P. et D. DUBOST. 1970. Progression du Bayoud dans la palmeraie d'In-Salah (Tidikelt, Algérie). *Al Awamia* 35 : 143-153.
- BULIT, J., J. LOUVET, D. BOUHOT et G. TOUTAIN. 1967. Recherches sur les Fusarioses. I – Travaux sur le bayoud, Fusariose du palmier dattier en Afrique du Nord. *Annales des Epiphyties* 18 : 213-239.
- CHETTAB, H., D DUBOST et A. KADA. 1978. Remarques sur l'identification du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (KILL. & MAIRE) MALENÇON. agent de la fusariose vasculaire du palmier dattier (bayoud). *Bulletin d'Agronomie Saharienne* 1 : 53-61.
- CHEVALIER, A. 1952. Recherches sur les *phoenix* africains. *Rev. Botanic* 32 : 355-356
- CORNER, E. J. H. 1966. *The natural history of palms*. Weidenfeld & Nicolson, London. 393p.
- CORRELL, J. C., C.J. R. KLITTICH et J.F. LESLIE. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *The American phytopathological society* 77 : 1640-1646.
- DJERBI, M. 1982. Le Bayoud en Afrique, problèmes et solutions, FAO. Regional projet for palm and dates research. Center in the Near East and North Africa, Baghdad. Iraq, 45p.
- DJERBI, M. 1983. Diseases of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). F.A.O. regional Project for Palm and Dates Researt Centre in the Near East and North Africa 106p.
- DJERBI, M., M.H. SEDRA et M. A. EL IDRISSE AMMARI. 1985. Caractéristiques culturelles et identification du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* agent causal du bayoud. *Annales de l'institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie* 58 :1-8.
- DJERBI, M., L. AOUAD, H. FILALI, M. SAAIDI, A. CHTIOUI, H. MY. SEDRA, M. ALLAOUI, T. HAMD AOUI et M. OUBRICH. 1986. Preliminary results of selection of high quality Bayoud resistant clones among natural date palm population in Marocco. The second symposium on the date palm ; Saudi Arabia 11 : 383-399.
- DJERBI, M. 1988. Les maladies du palmier dattier. Projet régional de lutte contre le bayoud. FAO, (Rab/84/018), Alger, 127p.
- DJERBI, M. 1990a. Méthodes de diagnostic du bayoud du palmier dattier. *Bulletin OEPP/EPPO* 20 : 607-613.
- DJERBI, M. 1990b. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, the causal agent of bayoud disease on the basis of vegetative compatibility. In : Proceedings of the Eighth Congress of the Mediterranean phytopathological Union. Morocco, 533 p.

- DJERBI, M., M.J.J. FREDRIX et K. DENBRABER. 1990. A new method of identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* on the basis of vegetative compatibility. In : Proceedings of the Eighth Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. Morocco, 513 p.
- DJERBI, M. 1991. Biotechnologie du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : voies de propagation des clones résistants au bayoud et de hautes qualités dattière. CIHEAM-options méditerranéennes 14 : 31-38.
- DJERBI, M. 1993. *Précis de phéniciculture*. Ed FAO, 191p.
- dransfield, J & N. W. Uhl. 1986. An outline of a classification of palms. *Principes* 30 : 3-11.
- DUBOST, D. 1972. The bayoud disease in Algeria, history and diagnosis. In Proceedings of the First International Seminar and Workshop on Bayoud, Algiers : 83-92.
- DUBOST, D et A. KADA. 1974. Etude expérimentale de l'inoculation de jeunes plantules de palmier dattier par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Bull. Agr. Sahar.* 1 : 21-37.
- DUBOST, D et A. KADA. 1975. Le Bayoud à Ghardaia. *Bull. Agr. Sahar.* 3 : 29-61.
- EL HADRAMI, I et A EL HADRAMI. 2009. Breeding date palm. Pp 191-216. In : *Breeding Plantation Tree Cops, Tropical Species*. Eds. S. Mohan Jain et P.M. Priyadarshan. Springer / Helsinki University-Finland, 653 p.
- EL HASSNI, M., A. EL HADRAMI, F. DAAYFI, F. CHERIF, E. AIT BARKA et I. EL HADRAMI. 2007. Biological control of Bayoud disease in date palm: selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. *Environmental and Experimental Botany* 59 : 224-234.
- ERIKSSON, OE et K. WINKA. 1997. Supraordinal taxa of Ascomycota. *Myconet* 1 : 1-6.
- ERIKSSON, OE. 2006. Outline of Ascomycota. *Myconet* 12 : 1-82.
- FERNANDEZ, D., L. MAURICE, M. OUINTEN, A. TANTAOUI. et J-P. GEIGER. 1995. Le bayoud du palmier dattier une maladie qui menace la phéniciculture. *Phytoma - La défense des végétaux-* 469 : 36-39.
- FERNANDEZ, D., M. OUINTEN, A. TANTAOUI et J-P. GEIGER. 1997. Molecular records of micro-evolution within the Algerian population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* during its spread to new oases. *European Journal of Plant Pathology* 103 : 485-490
- FERNANDEZ, D., M. OUINTEN, A. TANTAOUI, J-P. GEIGER, M-J. DABOUSSI et T. LANGIN. 1998. Fot 1 insertions in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* genome provide diagnostic PCR targets for detection of the date palm pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 64 : 633-636.
- FREEMAN, S et M. MAYMON. 2000. Reliable detection of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, causal agent of bayoud disease of date palm, using molecular techniques. *Phytoparasitica* 28 : 1-8.
- GORDON, W. L. 1965. Pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Can J. Bot.* 43 : 1309-1318.

- KADRI, Y. 2008. Caractérisation de la variabilité biologique et pathologique de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Killian et Maire) W. L. Gordon et essai de méthodes de lutte « in vitro ». Thèse de Magister en Science Agronomiques .ENSA. El Harrach, 66 pp
- KILLIAN, C et R. MAIRE. 1930. Le Bayoud maladie de dattier. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord* 21 : 89-101.
- KISTLER, H. C. 1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 4 : 474-479.
- LESLIE, F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopathol* 31:127-50.
- LESLIE, J. F et B. A. SUMMERELL. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. *Blackwell publishing* 388p.
- LOUVET, J. 1977. Observations sur la localisation des chlamydospores de *Fusarium oxysporum* dans les tissus des plantes parasitées. Travaux dédiés à G.Viennot Bourgin, INRA, Société Française de phytopathologie, Paris : 193-197.
- LOUVET, J. 1991. Que devons nous faire pour lutter contre le bayoud ?. Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-aride. Ed. Groupe d'étude de l'arbre, Paris, France, 337-346.
- LUTTRELL, E. S.1955. The Ascstromatic Ascomycetes. *Mycologia* 47 : 511-532.
- MALENÇON, G. 1934. Nouvelles observations concernant l'étiologie du bayoud. *C.R. Hebd. Séance Acad. Sc. Paris. Série D.* 196 : 1259-1262.
- MALENÇON, G. 1950. Le bayoud, maladie fusarienne du palmier en Afrique du Nord. *Fruits* 5 : 279-289.
- MUNIER, P. 1973. *Le palmier dattier*. Paris : Ed, maisonneuve et Larose, 209p
- O.E.P./OPPE. 2003. Diagnostic protocols for regulated pests. *Bulletin* 33 : 245-247.
- OUINTEN, M. 1991. Etude de la compatibilité végétative chez des isolats Algériens et Marocains du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* agent du bayoud du palmier dattier. Mémoire de maîtrise en biologie des organismes et des populations. Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, 30p.
- OUINTEN, M. 1996. Diversité et structure génétiques des populations Algériennes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* agent de la fusariose vasculaire (bayoud) du palmier dattier. Thèse de doctorat. Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, 170p.
- PUHALLA, J. E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* 63 : 179-183.
- RAPILLY, F. 1968. *Les techniques de mycologie en pathologie végétale. Annales Epiphytique*, Edition INRA Paris. 102p.
- SAADI, I., A. NAMSI, O. BENMAHMOUD, M. L. TAKROUNI, A. ZOUBA, M. BOVE et N. DURAN-VILA. 2006. First report of "Maladie des feuilles Cassantes" (brittle leaf disease) of date palm in Algeria. *Plant Pathology* 55 : 572.
- SAAIDI, M. 1979. Contribution à la lutte contre le bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier. Thèse de doctorat d'Université de Dijon, France, 210p.

- SAAIDI, M., G. TOUTAIN, H. BANNEROT et J. LOUVET. 1981. La sélection du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) pour la résistance au Bayoud. *Fruits* 36 : 241-249.
- SEDRA, M.H et M. DJERBI. 1985. Mise au point d'une méthode rapide et précise d'identification « *in vitro* » du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* agent causal du bayoud. *Annales de l'institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie* 58 : 1-12.
- SEDRA, My. H. 1993a. Caractères morphologiques et culturaux du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal de la fusariose vasculaire (Bayoud) du palmier dattier *AL Awamia* 83 : 209-222, INRA-Rabat Maroc
- SEDRA, My. H et My. A. EL IDRISSEI TOURANE. 1995. Isolement de microorganismes antagonistes au *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* à partir de deux sols de palmeraies résistant et sensible au bayoud. Séminaire international du palmier dattier. *Option Méditer. Elché, Espagne*.
- SEDRA, MY H. 2003. Le bayoud du palmier dattier en Afrique du nord. FAO, RNE/ SNEA-TUNIS. 125 p
- SNYDER, W. C. et H. N. HANSEN. 1954. Variation and specialisation in the genus *Fusarium* *Ann. N. Y. Acad. Sci* 60 : 16-23.
- SERGENT. E et M. BEGUET. 1921. Sur la nature mycosique d'une nouvelle maladie des dattiers menaçant les oasis marocaines. *C.R. Acad. Sc. Paris* 172 : 1624-1627.
- TAKROUNI, L., A. R'HOUMA, O. KHOUALDIA et B. ALLOUCHI. 1988. Observations préliminaires sur deux graves «maladies» d'origine inconnue du palmier dattier en Tunisie. *Annales de l'INRAT* 61 : 1-16.
- TANTAQUI, A. 1989. Contribution à l'étude de l'écologie du *F.o.* f. sp. *albedinis* agent du bayoud. Densité et répartition de l'inoculum au sein du peuplement Fusarien. D. E. S. Université CADI AYYAD Marrakech, 104p.
- TANTAQUI, A. et C. BOISSON. 1991. Compatibilité végétative d'isolats du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *Fusarium oxysporum* de la rhizosphère du palmier dattier et des sols de palmeraies. *Phytopathology.Medit* 30 : 155-163.
- TANTAQUI, A. et D. FERNANDEZ. 1993. Comparaison entre *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *Fusarium oxysporum* des sols de palmeraies par l'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP). *Phytopathology.Medit* 32 : 235-244.
- TANTAQUI, A., M. OUINTEN, J-P GEIGER et D. FERNANDEZ. 1996. Characterization of a single clonal lineage of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* causing bayoud disease of date palm in morocco. *Phytopathology* 86 : 787-792.
- TOUTAIN, G. 1965. Note sur l'épidémiologie du bayoud en Afrique du Nord. *Al Awamia* 15 : 37-45.
- TOUTAIN, G. 1967. Le palmier dattier culture et production. *Al Awamia* 25 : 84-143.
- TRIKI, M.A., A. ZOUBA, O. KHOUALDIA, O. BEN MAHMOUD, M. I. TAKROUNI, M. GARNIER, J. M. BOVE, M. MONTARONE, A. POUPET, R. FLORES, A. DAROS, Z. G. N. JFADDA, P. MORINO et N. DURAN-VILLA. 2003. Maladies des feuilles cassantes or brittle leaf disease of date palms in Tunisia : biotic or abiotic disease?, *Journal of Plant Pathology* 85 : 71-79.

WEIGAN, F., M. BAUM and S. M. UDUPA. 1993. DNA molecular marker techniques. Technical Manual N° 20. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. (ICARDA), Aleppo, Syria.

ZAID, A., P. F. de WET. 2002. Origin, geographical distribution and nutritional values of date palm. In : Date palm cultivation. Ed. FAO. Rev 1 : 156.

WEBOGRAPHIE

STATISTIQUES FAO, 2004. : www.Faostat.FAO.org

STATISTIQUES FAO, 2008. : www.Faostat.FAO.org

ANNEXES

- Milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar)

Pomme de terre	200 g
Glucose (Dextrose)	20 g
Agar	20 g
Eau distillée qs p	1000 ml

- Milieu de culture malt

Extrait de malt	20 g
Agar	20 g
Eau distillée qs p	1000 ml

- Milieu de culture sabouraud

Peptone	10 g
Glucose	30 g
Agar	20 g
Eau distillée qs p	1000 ml

- Milieu de culture Komada

KH_2PO_4	1 g
KCL	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Fe-Na-EDTA	0,01 g
L-Asparagine	2 g
Eau distillée qs p	1000 ml

Après l'autoclavage et une fois le milieu refroidi (50C°), on y ajoute les agents antimicrobiens suivants :

Pentachloronitrobenzene (PCNB)	1 g
Oxgall	0,5 g
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	1 g
Sulfate de Streptomycine	0,3 g

Annexe 1

Caractérisation morphologique et génétique de quelques isolats de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Killian & Maire) W. L. Gordon, agent causal de la fusariose du palmier dattier.

2.1. Milieux de culture utilisés dans la technique de la compatibilité végétative

- Milieu de base

Saccharose	30 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	10 mg
KCL	0,5 g
Agar	20 g
Solution d'oligo-éléments	0,2 ml
Eau distillée	1000 ml

- Solution d'oligo-éléments

Acide citrique	5 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5 g
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	1 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	4,75 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	250 mg
MnSO ₄ .H ₂ O	50 mg
H ₃ BO ₃	50 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	50 mg
Eau distillée	95 ml

- Milieu de sélection des mutants chlorate-résistants KPS

Chlorate de potassium (KClO ₃)	15g
Pomme de terre	200g
Saccharose	20g
Eau distillée q.s p.	1000 ml

2.2. Milieux de caractérisation des mutants pour l'assimilation des nitrates

- Milieu nitrate minimum : MM

Milieu de base	1000 ml
NaNO ₃	2g

- Milieu nitrite

Milieu de base	1000 ml
NaNO ₂	0,5g

- Milieu hypoxanthine

Milieu de base	1000ml
Hypoxanthine	0,2 g

Annexe 2

3.1. Composition des solutions utilisées dans l'extraction de l'ADN

- CTAB (Cetyltrimethyl-Ammonium Bromide)

NaCl	20,45 g
Tris-base	3,025 g
EDTA	1,86 g
CTAB	10 g
Eau distillée qs p	250 ml

(Ajuster le PH à 8 avant de compléter le volume à 250 ml)

500 µl de B-mercaptoethanol sont ajoutés à la solution lors de la manipulation

- Mélange chloroforme / Alcool isoamilique

Chloroforme	24 ml
Alcool isoamilique	1 ml

- Tampon de lavage

Acétate d'ammonium	0,195 g
Ethanol absolu	190 ml
Eau distillée qs p	250 ml

(Le tampon de lavage est conservé au congélateur à -20°C)

- Tampon TE (Tris EDTA)

Tris-base	0,303 g
ADTA	0,093 g
Eau distillée qs p	250 ml.

(Ajuster à PH 8. Conserver au frigo à 4°C)

ANNEXE 3

4.1 Extraction de l'ADN

- Racler le contenu de 1 à 2 boîtes de pétri de mycélium frais à l'aide d'une pipette en verre, récupérer le mycélium (1 g) dans un micro-tube à 2 ml et ajouter 1 ml de CTAB à 0,2% mercapto-éthanol (chauffé préalablement à 65 C°, et vortexer pendant 1 minute environ)
- Après homogénéisation dans le tampon de lyse, le tube est mis en incubation pendant 30 mn à 65 C° dans un bain marie avec agitation.
- Additionner 900 µl de chloroforme-alcool isoamilique (24 :1) puis mélanger doucement pendant 20mn sur un agitateur.
- Centrifuger à 13000 tours/mn pendant 20 mn puis récupérer la phase supérieure aqueuse dans un autre micro-tube.
- Additionner 900 µl de chloroforme-alcool isoamilique (24 :1) puis mélanger doucement pendant 20mn sur un agitateur.
- Centrifuger à 13000 tours/mn pendant 20 mn puis récupérer la phase supérieure aqueuse dans un autre micro-tube
- Additionner 500 µl de 2-propanol froid (-20C°) et agiter à la main doucement jusqu'à la précipitation de l'acide nucléique, ensuite le tube est mis dans le réfrigérateur à 4 C° pendant 30 mn.
- Centrifuger à 13000 tours/mn pendant 20 mn puis éliminer le surnageant et vérifier la présence du culot d'ADN précipité au fond du tube.
- Ajouter 1 ml de tampon de lavage puis incubé à 4 C° pendant 60 mn
- Centrifuger à 13000 tours/mn pendant 10 mn ensuite éliminer le surnageant tout en s'assurant que le culot d'ADN est présent dans le tube, ce dernier est égoutté en le laissant inversé sur du papier buvard dans la hotte pour sécher dans un endroit stérile.
- Reprendre le culot d'ADN dans 500 µl de T.E et laisser se dissoudre doucement à 4 C° toute la nuit

ANNEXE 4

5.1 Tampon utilisés lors de l'électrophorèse

- TBE 1X (Tris Borate EDTA)

Tris-base	10,8 g
Acide Borique	5,5 g
EDTA 0,5M à PH8	4 ml
Eau distillée qs p	1000 ml

- BET (Bromure d'éthyidium)

2 pastilles	0,2 g
Eau distillée	20 ml

5.2 Tampon de charge

Bleu de bromophénol	0,01 g
Glycerol	2 ml
Eau distillée	3 ml

ANNEXE 5

Estimation de la qualité et la quantité d'ADN

La qualité et la quantité d'ADN sont estimées grâce à un spectrophotomètre par mesure de la densité optique. En effet l'ADN absorbe les UV à 260 nm, alors que les protéines absorbent les UV à 280 nm. La qualité de l'ADN est vérifiée en effectuant le rapport des deux lectures données par le spectromètre aux deux longueurs d'ondes 260 nm et 280 nm (absorbance à 260nm / absorbance à 280nm). La bonne qualité d'ADN doit avoir une valeur entre 1,8 et 2,0. Pour cela 10 µl d'ADN ont été dissous dans 990 µl de TE, après agitation à la main sont versés dans le trisme de spectromètre. La quantité d'ADN est obtenue par la formule suivante :

$$\text{ADN } (\mu\text{g} / \mu\text{l}) = (\text{DO } 260 \times 100 \text{ (facteur de dilution)} \times 50 \mu\text{g} / \mu\text{l}) / 1000$$

ANNEXE 6

Préparation du milieu réactionnel

Pour un seul échantillon nous avons préparé une solution de volume finale de 25 µl composée de :

DNTP	0, 25 µl
Tampon PCR 5X	1, 25 µl
Amorce	0, 15 µl
ADN	3 µl
L'enzyme Taq polymérase	0,2 µl
Eau ultra pure	20,15 µl

ANNEXE 7

ISOLATS	GROUPES HOMOGENES
S24-08-AD	A
S21-08-AD	AB
S23-08-AD	ABC
S22-08-AD	ABCD
S27-08-AD	ABCDE
S10-08-AD	ABCDEF
S9-02-AD	ABCDEF
S11-07-GH	BCDEF
S25-08-AD	BCDEF
S12-04-GH	BCDEFG
S43-08-AD	BCDEFGH
S41-08-AD	BCDEFGHI
S37-08-AD	BCDEFGHI
S1-02-AD	BCDEFGHI
S3-02-AD	BCDEFGHI
S38-08-AD	CDEFGHI
S5-02-AD	CDEFGHI
S30-08-AD	CDEFGHI
S17-08-AD	CDEFGHI
S8-02-AD	CDEFGHI
S40-08-AD	CDEFGHIJ
S16-03-GH	CDEFGHIJ
S4-02-AD	CDEFGHIJ
S15-05-GH	CDEFGHIJ
S2-02-AD	CDEFGHIJ
S19-08-AD	CDEFGHIJ
S26-08-AD	DEFGHIJ
S18-08-AD	DEFGHIJ
S6-02-AD	EFGHIJK
S36-08-AD	EFGHIJK
S39-08-AD	EFGHIJK
S13-06-GH	EFGHIJK
S42-08-AD	F GHIJK
S29-08-AD	F GHIJK
S28-08-AD	F GHIJK
S20-08-AD	F GHIJK
S7-02-AD	F GHIJK
S14-06-GH	F GHIJK
S32-08-AD	F GHIJK
S35-08-AD	GHIJK
S44-08-AD	HIJK
S31-08-AD	IJK
S34-08-AD	JK
S33-08-AD	K

ANNEXE 8