جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
ⵜⴰⵙⴷⴰⵡⵉⵜ ⵙⵉⴷⵉ ⵎⵓⵃⵎⴷ ⴱⵏ ⵄⴱⴷⵍⵍⴰⵀ ⴱ ⴼⴰⵙ
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES

كلية العلوم ظهر المهراز فاس
ⵜⴰⵖⵢⴻⵍⵜ ⵏ ⵜⵣⵔⴼⵜ ⴰⵎⵓⵔⴰⵙ ⵎⵣⵔⴰⵔ ⴼⴰⵙ
FACULTE DES SCIENCES DHAR EL MAHRAZ FES

N° d'ordre : 16 /2024

Centre des Études Doctorales : Sciences et Techniques et Sciences Médicales

Formation Doctorale : Molécule Bioactive Santé et Biotechnologie

Discipline : Biologie

Spécialité : Microbiologie, Biologie Moléculaire et Protection des plantes

Laboratoire de Biotechnologie, Environnement, Agroalimentaire et Santé

Thèse pour l'obtention de DOCTORAT

NEMATODES PHYTOPARASITES DES AGRUMES AU MAROC : IDENTIFICATION, DISTRIBUTION ET LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE *TYLENCHULUS SEMIPENETRANS*

Présentée par : **ZOUBI Btissam**

Soutenue le 20/04/2024 devant le jury :

Pr. EL HASSOUNI Mohammed	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès	**Président**
Pr. BENAMAR Saad	PES	École Normale Supérieure - Fès	**Rapporteur and Examinateur**
Pr. TAHIRI Abdessalem	PES	École Nationale d'Agriculture -Meknès	**Rapporteur and Examinateur**
Pr. BELHAJ Abdelhaq	PES	Faculté des Sciences - Meknès	**Rapporteur and Examinateur**
Dr. MOKRINI Fouad	Directeur de recherche et expert en Nématologie	Institut National de la Recherche Agronomique-Rabat	**Examinateur**
Pr. LAHLALI Rachid	PH	École Nationale d'Agriculture -Meknès	**Examinateur**
Pr. BENDRISS AMRAOUI Mohammed	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mehraz-Fès	**Examinateur**
Pr. IRAQI HOUSSEINI Abdel Ilah	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mehraz-Fès	**Directeur de thèse**
Pr. QADDOURY Ahmed	PES	Faculté des Sciences et Techniques-Marrakech	**Co-Directeur de thèse**

Année Universitaire : 2023-2024

AVANT PROPOS

- **Nom et Prénom de l'auteur :** ZOUBI Btissam
- **Intitulé du travail :** Nématodes phytoparasites des agrumes au Maroc: identification, distribution et lutte biologique contre *Tylenchulus semipenetrans*.
- **Encadrants:**
  - **Nom, prénom et grade :** Pr. IRAQI HOUSSEINI Abdelilah [(1)] (PES), Pr. QADDOURY Ahmed [(2)] (PES) et Dr. MOKRINI Fouad (Directeur de recherche et expert en nématologie) [(3)].
  - **Laboratoires et institutions :**

[(1)] Laboratoire de Biotechnologie, Environnement, Agroalimentaire et Santé, Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fès.

[(2)] Centre d'Agrobiotechnologie et de Bioingénierie, Unité de Recherche Labellisée CNRST, Faculté des Sciences et Techniques - Gueliz, Marrakech.

[(3)] Unité de Biotechnologie, Institut National de la Recherche Agronomique, INRA-Rabat

- **Lieux de réalisation des travaux (laboratoires, institution) :**
  - Laboratoire de Biotechnologie, Environnement, Agroalimentaire et Santé, Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fès, Maroc.
  - Centre d'Agrobiotechnologie et de Bioingénierie, Unité de Recherche Labellisée CNRST, Faculté des Sciences et Techniques - Gueliz, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc
  - Unité de Biotechnologie, Institut National de la Recherche Agronomique, INRA-Rabat, Maroc.
- **Période de réalisation du travail de thèse :** Décembre 2018 - Décembre 2022
- **Ce travail a donné lieu aux résultats suivants (publications, communications) :**
  - **Publications :**

1. **ZOUBI, B**., MOKRINI, F., DABABAT, A. A., AMER, M., GHOULAM, C., LAHLALI, R., LAASLI, S.-E., KHFIF, K., IMREN, M., AKACHOUD, O., BENKEBBOURA, A., HOUSSEINI, A. I., and QADDOURY, A. (**2022)**. Occurrence and Geographic Distribution of Plant-Parasitic Nematodes Associated with Citrus in Morocco and Their Interaction with Soil Patterns. **Life**, 12(5), 637.
2. **ZOUBI, B**., MOKRINI, F., AMER, M., CHERKI, G., RAFYA, M., BENKEBBOURA, A., AKACHOUD, O., LAASLI, S.E., HOUSSEINI, A. I., LAHLALI, R., and QADDOURY, A. (**2023**). Eco-friendly management of the citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans* using some aromatic and medicinal plants. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, 56(1), 66-86.

3. **ZOUBI, B**., MOKRINI, F., GHOULAM, C., HOUSSEINI, A. I., and QADDOURY, A. (**2023**). The efficiency of *Thymus vulgaris* against citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans*. **Journal of Analytical Sciences and Applied Biotechnology**, 5(1), 5-1

- **Communications :**

1. **ZOUBI Btissam,** MOKRINI Fouad, ET IRAQI HOUSSEINI Abdelilah 2019. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS DE FEUILLES DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* ET DE *LAURUS NOBULIS*. 7 éme édition de L'Ecole Internationale de Recherche organisée sous le thème : Biodiversité, Biotechnologies et Développent Durable Du 25 au 27 avril 2019 à la faculté des Sciences- Agadir, Maroc.
2. **ZOUBI Btissam,** MOKRINI Fouad ET IRAQI HOUSSEINI Abdelilah 2019. PHYTOPARASITIC NEMATODES ASSOCIATED WITH CITRUS IN THE REGION OF SOUSS; 2nd International Scientific Day of Taroudant.2nd November, polydisciplinary faculty of Taroudant.
3. **ZOUBI Btissam**, QADDOURY Ahmed, MOKRINI Fouad et IRAQI HOUSSEINI Abdelilah, 2021. DIVERSITY AND COMMUNITY ANALYSIS OF PLANT PARASITIC NEMATODES ASSOCIATED WITH CITRUS IN MARRAKECH–SAFI REGION OF MOROCCO. The first edition of the international Congress: "Sustainable Agriculture: Tools and Innovations" (AgriNov2021).
4. **ZOUBI Btissam,** MOKRINI Fouad, IRAQI HOUSSEINI Abdelilah et QADDOURY Ahmed 2022. THE IMPACT OF ESSENTIAL OILS OF *FOENICULUM VULGARE* AGAINST *TYLENCHULUS SEMIPENETRANS.* ''1er Webinaire International sur la Biodiversité et la Valorisation Végétales et Microbiennes (WIBVVM)''. 13-15 Décembre 2022.
5. **ZOUBI Btissam,** MOKRINI Fouad, IRAQI HOUSSEINI Abdelilah et QADDOURY Ahmed 2022. THE IMPACT OF ESSENTIAL OILS OF THE *LAMIACEAE* FAMILY AGAINST *TYLENCHULUS SEMIPENETRANS.* IIème Symposium International ≪ Pharmacologie, Phytotherapie et Phytochimie des Plantes Aromatiques et Medicinales ≫ (SI4P-2022).
6. **ZOUBI Btissam,** MOKRINI Fouad, IRAQI HOUSSEINI Abdelilah et QADDOURY Ahmed 2022. STUDY OF PLANT PARASITIC NEMATODES ASSOCIATED WITH CITUS IN GHARB REGION OF MOROCCO. Séminaire Internationale sur les Biotechnologies au Service de l'Agriculture Durable. (SIBSAD – Blida 25, 26 Juin 2022).
7. **ZOUBI Btissam,** MOKRINI Fouad, IRAQI HOUSSEINI Abdelilah et QADDOURY Ahmed 2023. NEMATICIDAL ACTIVITY OF MORINGA OLEIFERA AND CHAMAEMELUM NOBILE AGAINST CITRUS NEMATODE *TYLENCHULUS SEMIPENETRANS*. Conference on Water, Agriculture, Environment and Energy Faculty of Sciences and Techniques, Fez – Morocco May 22 – 23, 2023.

DEDICACES

À mes parents bien-aimés

En témoignage de leur amour inconditionnel, de leur affection et de leurs sacrifices incommensurables. Leurs conseils précieux m'ont guidé tout au long de mes études et je suis convaincu qu'ils continueront à me guider dans les prochaines étapes de ma vie. Que Dieu leur accorde santé et longévité.

À mon mari

À travers les hauts et les bas, tu as été mon roc, ma source de réconfort et d'inspiration. Ton amour inconditionnel et ta présence bienveillante m'ont donné la force nécessaire pour surmonter les obstacles et persévérer dans mes efforts.

Tu as été mon plus grand fan, mon critique constructif, et mon partenaire dans cette aventure de la vie. Tes encouragements constants ont été la lumière qui a éclairé mon chemin, me poussant à donner le meilleur de moi-même.

À mon cher fils Imrane

À toi, mon petit rayon de soleil, qui illumine ma vie de bonheur et d'amour, je dédie cette dédicace avec tout mon cœur.

À mes sœurs et frère adorés

Pour leur soutien indéfectible et leurs encouragements constants tout au long de mon parcours académique.

À mes amis et collègues

En souvenir des moments merveilleux que nous avons partagés ensemble, je vous dédie cette thèse avec tout mon respect, mes souhaits de réussite et de bonheur. Que cette thèse soit le témoignage de l'amitié sincère que je ressens pour vous.

À tous mes enseignants

Veuillez accepter dans cette thèse l'expression de ma profonde gratitude et de mon immense respect.

Et à toute personne qui a consacré un moment de sa vie pour m'aider, me conseiller ou m'encourager.

REMERCIEMENTS

La réalisation de cette thèse a été une passionnante aventure scientifique, ponctuée d'expériences enrichissantes. Réaliser ce travail a représenté un véritable défi personnel, exigeant des efforts considérables. Toutefois, au-delà de ces défis, cette thèse est également le récit d'une belle histoire de relations, de rencontres et d'amitiés.

À l'issue de ce parcours doctoral, qui demeure l'un des moments les plus marquants de ma vie académique et personnelle, je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers toutes les personnes qui m'ont soutenue et accompagnée. Sans leur aide précieuse, je n'aurais jamais pu achever ce travail.

Je tiens à remercier Dieu tout-puissant, qui m'a guidée sur le chemin de ma vie et m'a donné la force nécessaire pour accomplir cette thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, monsieur le professeur **IRAQI HOUSSEINI Abdel Ilah**, Professeur d'Enseignement Supérieur en Microbiologie Appliquée à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès. Je suis extrêmement reconnaissante qu'il ait accepté de diriger mon travail avec bienveillance. Ses conseils avisés, son encadrement de qualité et ses vastes connaissances scientifiques ont été d'une aide précieuse pour la réalisation de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon co-directeur de thèse, monsieur le professeur **QADDOURY Ahmed** pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail de thèse. Votre rôle a été crucial pour la réussite de ce projet de recherche. Votre expertise, vos conseils avisés et votre disponibilité ont été des atouts précieux qui m'ont permis de progresser dans mes travaux et d'atteindre les objectifs fixés. Vos commentaires constructifs et votre exigence intellectuelle m'ont incité à donner le meilleur de moi-même.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude au professeur **MOKRINI Fouad** pour avoir proposé ce travail de recherche et pour son expertise dans l'identification morphologique des nématodes. Sa précieuse aide et son soutien inconditionnel m'ont été d'une immense valeur. De plus, sa proximité fraternelle a rendu cette aventure académique encore plus enrichissante.

Je remercie chaleureusement le professeur **GHOULAM Cherki** pour sa disponibilité et son aide précieuse qui ont grandement facilité la réalisation de mes expérimentations.

J'exprime ma profonde gratitude envers le Professeur **HIJRI Mohammed** pour m'avoir offert l'opportunité d'effectuer un stage au sein de son laboratoire (AGC) à UM6P Benguérir. Votre mentorat a été un pilier essentiel dans mon développement professionnel. Votre générosité et votre dévouement sont grandement appréciés.

J'adresse aussi mes sincères remerciements :

À Monsieur le professeur **EL HASSOUNI Mohammed**, vice doyen chargé de la recherche scientifique et de la coopération. Vous m'honorez en évaluant ce modeste travail et en acceptant de présider le jury. Je suis consciente de vos nombreuses responsabilités et je suis d'autant plus reconnaissante pour le temps que vous consacrez à cette tâche. Veuillez accepter, Monsieur, l'expression de ma profonde reconnaissance.

À monsieur **BENAMAR Saad** Professeur de l'enseignement supérieur à l'École Normale Supérieure-Fès. Veuillez trouver ici cher Professeur, l'expression de ma vive

reconnaissance. Votre expertise et vos conseils précieux contribuent grandement à l'amélioration de la qualité de ce travail. C'est un honneur pour moi de recevoir votre évaluation. Veuillez accepter mes sincères remerciements.

À monsieur **TAHIRI Abdessalem** Professeur de l'enseignement supérieur à l'École Nationale d'Agriculture - Meknès, Veuillez trouver ici cher Professeur, l'expression de ma haute considération. Je tiens à vous dire que c'est un grand honneur pour moi que vous soyez rapporteur de ce modeste travail.

À monsieur **BELHAJ Abdelhaq** Professeur de l'enseignement supérieur de microbiologie à la Faculté des Sciences – Meknès. Je tiens à exprimer ma profonde estime pour votre contribution en tant que rapporteur de ce travail.

À monsieur **LAHLALI Rachid** Professeur habilité à l'École Nationale d'Agriculture – Meknès. Je tiens à vous exprimer ma gratitude pour votre acceptation de juger ma thèse. C'est un honneur pour moi de bénéficier de votre expertise et de votre soutien. Votre aide précieuse en matière d'identification moléculaire de nématodes et de champignons a été d'une grande valeur pour moi. Je suis reconnaissante pour votre disponibilité et votre soutien chaque fois que j'en ai eu besoin. Veuillez accepter l'expression de ma plus grande estime et de ma profonde reconnaissance.

À monsieur **BENDRISS AMRAOUI Mohammed** Professeur de l'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences Dhar EL Mahraz, de m'avoir fait l'honneur d'être parmi les honorables membres du jury en tant qu'examinateur afin de juger et enrichir ce travail par ses conseils. Qu'il trouve ici le témoignage de mon profond respect et ma haute considération.

À tout le personnel **des domaines agricoles** et à tous **les agriculteurs** qui nous ont généreusement accordé leur soutien pour réaliser nos prospections et prélèvements dans leurs vergers.

À l'attention des éléments de la **Gendarmerie Royale**, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude pour leur aide inestimable dans la localisation des vergers et la facilitation de la communication avec les agriculteurs. Leur soutien a été crucial pour la réussite de notre recherche et nous leur sommes extrêmement reconnaissants.

Je destine également mes plus sincères remerciements à ma famille : Mes parents, mon frère, mes sœurs, mon mari et beaux-parents, qui m'ont accompagné, aidé, soutenu et encouragé tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Enfin j'adresse mes vifs remerciements à toute personne que je n'ai pas nominée ayant participée de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci à toutes et à tous

Résumé

La filière des agrumes, dont les exportations s'élèvent à 480 millions de dollars, est un secteur stratégique pour l'équilibre de la balance commercial marocaine. Cependant, depuis quelques années, ce secteur est confronté à plusieurs contraintes biotiques et abiotiques limitant sérieusement son potentiel de production. Parmi ces contraintes, les plus menaçants sont les nématodes phytoparasites (NPP) qui peuvent causer des pertes de rendement de 10 à 30%. La gestion des NPP s'appuie largement sur l'utilisation des nématicides chimiques, dangereux pour l'homme et l'environnement. Leur action éphémère et leur impact sur les coûts de production rendent nécessaire la recherche d'alternatives durables. L'objectif principal de cette thèse est double. Le 1er consiste à étudier la répartition géographique des NPP dans les cinq principales régions agrumicoles nationales, et leur dynamique en fonction des saisons et des conditions agronomiques. Le 2 ème objectif porte sur la recherche d'outils biologiques pour lutter contre le nématode *T. semipenetrans*. Il s'agit de : 1) sélectionner les porte-greffes résistants à ce nématode, 2) explorer le potentiel nématicide du microbiome rhizosphérique (bactéries, champignons, CMA) des agrumes, et 3) évaluer la toxicité de certaines plantes aromatiques et médicinales contre *T. semipenetrans*.

Vingt-et-un genres et dix espèces de NPP ont été recensés dans les matrices du sol et racines des agrumes dont *Tylenchulus semipenetrans* (100%), *Helicotylenchus* spp. (62,5%) et *Pratylenchus* spp. (66,7%) sont les plus prévalent. La diversité des NPP est plus importante au niveau des régions de Marrakech-Safi, Beni Mellal-Khenifra et Gharb qu'au niveau de Berkane et Souss-Massa. Les NPP sont plus abondants au printemps au niveau du domaine Graoua, suivi par le domaine Benkebboura et d'Arsat Moulay Abdeslam. *T. semipenetrans*, *Helicotylenchus* spp. et *Xiphinema* spp. ont été rencontrés pendant toutes les saisons et dans les trois sites. *T. semipenetrans* a été le plus prévalent, en particulier au printemps. Une corrélation étroite a été relevée entre la dynamique des NPP, les saisons et les propriétés du sol. Le *Citrange carrizo* a montré une forte résistance à l'infestation et à la reproduction de *T. semipenetrans*, tandis que le *Citrange troyer*, le *Citrange C-35* et le *Citrus macrophylla* ont présenté une tolérance modérée. En revanche, le Bigaradier, le Bigaradier Australian et le *Citrus volkameriana* se sont avérés être les plus sensibles à ce nématode. La caractérisation microbiologique du sol rhizosphériques et des racines des agrumes a permis d'isoler une centaine de micro-organismes parmi lesquels, 10 antagonistes (5 bactéries, 3 champignons et 2 CMA) ont été sélectionnés grâce à leurs pouvoirs nematicides contre *T. semipenetrans* : *Variovorax paradoxus* (**OQ651063**), *Bacillus pseudomycoides* (**OQ652044**), *Bacillus simplex* (**OQ651985**), *Bacillus cereus* (**OQ651999**), *Paracoccus speluncae* (**OQ652010**), *Paecilomyces lilacinus* , *Aspergillus ustus* (**OR250163**), *Aspergillus terreus* (**OR250916**), *Funneliformis mosseae*, and *Rhizophagus irregularis* En outre, parmi les sept espèces de plantes aromatiques et médicinales testées, *Rosmarinus officinalis* et *Thymus vulgaris* ont montré l'efficacité nématicide la plus importante avec une forte toxicité contre *T. semipenetrans*. Ces outils biologiques pourraient servir à l'élaboration de nouveaux bionématicides efficaces contre ce nématode, tout en stimulant la croissance des agrumes.

Mots clés : Agrumes ; *T. semipenetrans* ; lutte biologique ; biologie moléculaire ; microorganismes ; nématodes phytoparasites ; molécules bioactives ; activité nématicide.

Abstract

The citrus industry, with exports amounting to $480 million, is a strategic sector for the balance of Morocco's trade. However, in recent years, this sector has faced several biotic and abiotic constraints seriously limiting its production potential. Among these constraints, the most threatening are the plant-parasitic nematodes (PPN) which can cause yield losses of 10 to 30%. The management of PPN relies heavily on the use of chemical nematicides, which are dangerous for humans and the environment. Their ephemeral action and their impact on production costs make it necessary to search for sustainable alternatives. The main objective of this thesis is to develop biological control methods against PPN, particularly *Tylenchulus semipenetrans*. This objective is divided into two sub-objectives. The first is to study the geographical distribution of PPN in the five main national citrus regions, and their dynamics according to seasons and agronomic conditions. The second sub-objective focuses on the search for biological tools to fight against the nematode *T. semipenetrans*. This involves: 1) selecting rootstocks resistant to this nematode, 2) exploring the nematicidal potential of the rhizospheric microbiome (bacteria, fungi, AMF) of citrus, and 3) evaluating the toxicity of certain aromatic and medicinal plants against *T. semipenetrans*.

Eleven genera and ten species of PPN have been recorded in the soil and root matrices of citrus, including *Tylenchulus semipenetrans* (100%), *Helicotylenchus* spp. (62.5%) and *Pratylenchus* spp. (66.7%) are the most prevalent. The diversity of PPN is more important in the regions of Marrakech-Safi, Beni Mellal-Khenifra and Gharb than in Berkane and Souss-Massa. The PPN are more abundant in spring at the Graoua domain, followed by the Benkebboura domain and the Arsate Moulay Abdeslam domain. *T. semipenetrans*, *Helicotylenchus* spp. and *Xiphinema* spp. were encountered in the three sites and during all seasons. *T. semipenetrans* was the most prevalent, especially in spring. A close correlation was noted between the dynamics of PPN, soil properties and seasons. The *Carrizo citrange* showed strong resistance to infestation and reproduction of *T. semipenetrans*, while the *Troyer citrange*, the *C-35 citrange* and the *Citrus macrophylla* showed moderate tolerance. On the other hand, the Bitter orange, the Australian Bitter orange and the *Citrus volkameriana* proved to be the most sensitive to this nematode. The microbiological characterization of the rhizospheric soil and roots of citrus has allowed the isolation of a hundred microorganisms among which, 10 antagonists (5 bacteria, 3 fungi and 2 AMF) have been selected thanks to their nematicidal powers against *T. semipenetrans*: *Variovorax paradoxus* (**OQ651063**), *Bacillus pseudomycoides* (**OQ652044**), *Bacillus simplex* (**OQ651985**), *Bacillus cereus* (**OQ651999**), *Paracoccus speluncae* (**OQ652010**), *Paecilomyces lilacinus , Aspergillus ustus* (**OR250163**), *Aspergillus terreus* (**OR250916**), *Funneliformis mosseae*, and *Rhizophagus irregularis*. In addition, among the seven species of aromatic and medicinal plants tested, *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* showed the most important nematicidal efficacy with a strong toxicity against *T. semipenetrans*. These biological tools could be used to develop new bionematicides that are effective against this nematode, while also stimulating the growth of citrus plants.

Keywords: Citrus; *T. semipenetrans*; biological control; molecular biology; microorganisms; plant-parasitic nematodes; bioactive molecules; nematicidal activity.

ملخص

تعتبر زراعة الحمضيات واحدة من الأعمدة التي يتأسس عليها النشاط الفلاحي في بلدنا, سواء بالنظر للمساحات الأرضية التي تشغلها هذه السلسلة الزراعية, أو بالنظر إلى حجم الإنتاج وأهمية الصادرات ،حيث تصل صادراتها إلى 480 مليون دولار، ورغم تضافر جهود الدولة و المهنيين بهذا القطاع, إلا أنه في السنوات الأخيرة عرفت تحديات صعبة على مستويات عدة ، وتشكل الديدان الخيطية الطفيلية (نيماتودا)، وخاصة النوع *Tylenchulus semipenetrans* التهديد الأكبر حيث تلحق أضرار كبيرة بأشجار الحوامض وتحد من انتاجيتها. كما ان القضاء بطريقة فعالة على *T. semipenetrans* يعتمد على المبيدات الكيميائية التي تشكل خطراً على الإنسان والبيئة على حد سواء. ويؤدي استعمالها المستمر إلى الرفع من تكاليف الإنتاج، مما يحتم علينا بالضرورة البحث عن بدائل بيولوجية أكثر أماناً واستدامة، الهدف الرئيسي لهذه الأطروحة هو تطوير طرق المكافحة البيولوجية ضد دودة الحمضيات *T. semipenetrans*. والذي ينقسم إلى هدفين فرعيين. يتمثل الهدف الفرعي الأول في دراسة التوزيع الجغرافي للديدان الخيطية الطفيلية المرتبطة بمحاصيل الحمضيات في خمس جهات زراعية وطنية، وكذلك تغيراتها وفقًا للمواسم والظروف الزراعية (الأصناف، المحامل، المحاصيل المرتبطة، المعايير الفيزيائية والكيميائية). ويتعلق الهدف الفرعي الثاني في البحث عن أدوات بيولوجية لمكافحة دودة الحمضيات *T. semipenetrans* حيث يتعلق الأمر بإختيار أصناف المحامل المقاومة للديدان، وكذلك استكشاف فعالية الكائنات الحية المجهرية (البكتيريا والفطريات)والنباتات العطرية والطبية (المستخلصات المائية/الزيوت الأساسية) في مكافحة دودة الحمضيات *T. semipenetrans*.

تشير النتائج المحصل عليها إلى تسجيل 11 جنسًا و10 أنواع من الديدان الخيطية الطفيلية للنباتات في التربة والجذور الحمضية، بما في ذلك (100%) *Tylenchulus semipenetrans* و (62,5%) *Helicotylenchus* spp. و(66.7%) *Pratylenchus* spp. كأكثرها إنتشارا. كما تتمتع جهة مراكش-آسفي وبني ملال-خنيفرة والغرب بتنوع أكبر في الديدان الخيطية مقارنة بمناطق بركان وسوس-ماسة ،وقد أظهرت دراسة التغير الموسمي أن الديدان الخيطية الطفيلية للحمضيات أكثر وفرة في فصل الربيع في موقع غراوة (Graoua) مقارنة بموقع Arsate Moulay Abdeslam و Benkebboura. بالإضافة إلى أنه تم العثور على *T semipenetrans* و .spp *Helicotylenchus* و *Xiphinema* spp. خلال جميع الفصول و في المواقع الثلاث ،كما أظهرت هذه الدراسة علاقة متينة بين الديدان الخيطية وخصائص التربة والتعاقب الموسمي والطرق الزراعية المعتمدة. و تمكنت *Citrange Carrizo* من مقاومة تكاثر *T. semipenetrans* بنسب قوية في حين أن *Citrange troyer* و *C-35 citrang* و *Citrus macrophylla* اظهروا مقاومتهم بنسب معتدلة ،لكن على الجانب الآخر أثبتت *Bigaradier* و *Bigaradier Australian* و *Citrus volkameriana* أنها الأكثر حساسية و مقاومة للنماتودا *T. semipenetrans* ، و قد مكنت الدراسة المبكروبيولوجية لتربة الحمضيات وجذورها بعزل مئات الكائنات الحية المجهرية، و تم انتقاء 10كائنات حية منها (5 بكتيريا ت و5 فطريات) اظهروا قدرتهم الفعالة في كبح النيماتود *T. semipenetrans* : *V. paradoxus* (**OQ651063**)، *B. cereus* ،*B. simplex* (**OQ651985**) ،B. *pseudomycoides* (**OQ652044**) (**OQ651999**)، *A. terreus* ،*A. ustus* (**OR250163**) ،*P. lilacinus* ،P. *speluncae* (**OQ652010**) (**OR250916**)، *F. mosseae* و *R. irregularis*). من بين سبع نباتات عطرية وطبية:كانت *R. officinalis* و*T. vulgaris* هما الأكثر فتكا ب *T. semipenetrans* , ، من من خلال كل هذا نستنتج أنه يمكن استخدام هذه الأدوات التكنولوجية الحيوية لتطوير مبيدات نيماتود الفعالة ضد *T. semipenetrans*.

الكلمات المفتاحية : الحمضيات؛ *T. semipenetrans*؛ مكافحة بيولوجية؛ علم الأحياء الجزيئي؛ الميكروبات؛ النيماتودا ؛ جزيئات نشطة حيوياً؛ نشاط مضاد للنماتودا.

ABRÉVIATIONS

AIA : Acide indole-3-acétique

BET: Bromure d'Ethidium

Ca: Calcium

Cat : Catalase

CE: Conductivité électrique

CMA : Champignons mycorhiziens à arbuscules

COT : Carbone organique totale

DL : dose létale

DO: Densité optique

E: Eveness

EA : Extraits aqueux

EM: Extrait de Malt

eV : électronvolts

h : Heure

H': Sannon-Winner

HEs : Huiles essentielles

IAA: Indolacétique

J: Jours

J2 : Juvéniles

K: Potassium

LB : Luria Bertani

MDA : Malondialdéhyde

MSR : Masse sèche racinaire

NaCl : chlorure de sodium

NaOCl: Hypochlorite de Sodium

RésistanceP: National Botanical. Research Institut's Phosphate

NIST : Institut national des normes et de la technologie

NPP : Nématodes phytoparasites

PAM : Plantes aromatiques et médicinales

PF: Population finale

PI : Population initiale

PO : Peroxydase

PPO : Polyphenoloxydase

Pr : Prévalence

Prot : Protéine

PVP : polyvinylpyrrolidone

q.s.p: Quantité suffisante pour

ROS : espèces réactives de l'oxygène

Tr: Temps de rétention

Trs/min : Tours par minute

TSB : bouillon de soja tryptique

TTC : 2,3,5-triphenyl-tétrazolium-chloride

u.a : unités arbitraires

UFC : Unité formant colonie

v/v: Volume/volume

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Shéma d'un arbre d'agrumes greffé 7
Figure 2. Production mondiale des principaux groupes d'agrumes commercialisés. 8
Figure 3. Nématode phytoparasite des agrumes *T. semipenetrans*. 12
Figure 4. Phylogénie du phylum des nématodes. 13
Figure 5. *T. semipenetrans* cobb. A. L'œsophage du mâle. B et C queues du mâle. D et E la queue et œsophage de la femelle immature. F. œsophage de J2. G. femelles attachées aux racines des agrumes. H. Cellules nourricières. I et J stade de développements de mâle et de femelle. 16
Figure 6. Distribution de *Tylenchulus semipenetrans* 17
Figure 7. Cycle de vie de *T. semipenetrans*. 19
Figure 8. Partie postérieure du corps de femelle de *T. semipenetrans* à l'extérieur de racine des agrumes où elle se nourrit. (a) microscope à dissection, (b) microscope électronique à balayage. 19
Figure 9. Modes d'action des champignons nématophages 25
Figure 10. Mécanismes possibles par lesquels les champignons arbusculaires mycorhiziens peuvent contrôler les nématodes phytoparasites 26
Figure 11. Mode d'action des bactéries contre les nématodes phytoparasites 27
Figure 12. Distribution des régions d'échantillonnage des agrumes. 32
Figure 13. Procédures d'échantillonnage suivies dans les vergers d'agrumes. 33
Figure 14. Densité totale de NPP dans les sols rhizosphériques (100 g) et les racines (20 g) de différentes régions agrumicoles marocaines étudiées. 41
Figure 15. Arbre phylogénétique des NPP isolés de différentes régions agrumicoles marocaines obtenue par l'analyse des séquences nucléotidiques de la région D2D3 d'ADNr 28S à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance. 48
Figure 16. Analyse en composante principale des paramètres physico-chimiques de sols en interaction avec les nématodes phytonématologiques des agrumes des différentes régions étudiées. 53
Figure 17. Organigramme général des procédures suivies au cours de ce chapitre. 60
Figure 18. Localisation des sites agrumicoles étudiés 61
Figure 19. Variation de la densité des nématodes phytoparasites (NPP) au niveau des racines (10g) et de sol (100g) rhizosphérique des agrumes dans différents sites de la région de Marrakech en fonction des saisons. 65
Figure 20. Matrice de corrélation entre les paramètres physico-chimique du sol, les saisons, les pratiques agricoles et paramètres nématologiques des trois sites durant les trois saisons 75
Figure 21. Corrélations statistiques par analyse en composantes principales (ACP) des paramètres physicochimiques et nématologiques des sols des trois sites, durant les trois saisons d'études. 76
Figure 22. Evaluation, *in vivo*, de l'effet nématicides des isolats bactériens et fongiques contre *T. semipenetrans* chez les porte-greffes d'agrumes *Citrange carrizo* (A) et *Citrus aurantium* (Bigaradier) (B) cultivés sous serre. 106
Figure 23. Quantification de l'ADN bactérien à l'aide des ratios A:260/280 et A:260/230. . 116
Figure 24. Amplification du gène ADNr 16S des différents isolats bactériens. 117
Figure 25. Arbre phylogénétique obtenue par l'analyse des séquences nucléotidiques de la région 16S d'ADNr de *Variovorax paradoxus* **OQ651063**, *Bacillus pseudomycoides*

OQ652044, *Bacillus simplex* **OQ651985**, *Bacillus cereus* **OQ651999** et *Paracoccus speluncae* **OQ659014**. 119
Figure 26. Arbre phylogénétique obtenue par l'analyse des séquences nucléotidiques de la région ITS d'ADNr 18S d'*Aspergillus terreus* **OR250916** et d'*Aspergilus ustus* **OR250163**. 120
Figure 27. Taux de Mortalité cumulé des juvéniles J2 de *T. semipenetrans* après 24h, 48h, 72h et 96h heures d'incubation in vitro. 121
Figure 28. Taux d'inhibition d'éclosion des œufs de *T. semipenetrans* après 48H, 96H et 144H de traitement avec différents isolats bactériens, *V. paradoxus* et *B. pseudomycoides*, *B. cereus*, *P. speluncae*, *B. simplex*, ou avec le traitement combiné 123
Figure 29. Taux de Mortalité cumulé des juvéniles J2 de *Tylenchulus semipenetrans* après 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h et 168h d'incubation *in vitro* en présence de suspension sporale fongique de *Aspergillus terreus, Aspergillus ustus, Paecilomyces lilacinus*, ou du traitement combiné 126
Figure 30. Taux d'inhibition d'éclosion des œufs de *T. semipenetrans* après 48h, 96h et 144h d'incubation *in vitro* en présence de suspension sporale fongique de *Aspergillus terreus, Aspergillus ustus, Paecilomyces lilacinus*, ou du traitement combiné à la concentration de 10^5 spores/ml.. 127
Figure 31. Effet des isolats bactériens sur la population de *Tylenchulus semipenetrans* dans le sol rhizosphérique (a) et dans les racines (b) et sur le taux de réduction de cette population dans le sol rhizosphérique (c) et dans les racines (d) chez *Citrus aurantium* et *Citrange carrizo* sous serre.. 129
Figure 32. Effet des isolats fongiques sur la population finale de *T. semipenetrans*, dans le sol rhizosphérique (a) et dans les racines (b), et sur le taux de réduction de cette population dans le sol rhizosphérique (c) et dans les racines (d) chez *Citrus aurantium* et *Citrange carrizo* sous serre. 130
Figure 33. Effet des isolats bactériens sur l'allongement des pousses et des racines (a), la production de biomasse sèche des pousses et des racines (b), et sur le taux d'accroissement de la longueur aérien et racinaire (c) et des biomasses aérienne et racinaire (d) chez *Citrange carrizo* et *Citrus aurantium* inoculées (I) ou non (NI) avec *T. semipenetrans* et cultivées sous serre.. 132
Figure 34. Effet des isolats fongiques sur l'allongement des pousses et des racines (a), la biomasse sèche des pousses et des racines (b), et sur le taux d'accroissement de la longueur aérien et racinaire (c) et des biomasses aérienne et racinaire (d) chez *Citrange carrizo* et *Citrus aurantium* inoculées (I) ou non (NI) avec *T. semipenetrans* et cultivées sous serre. 134
Figure 35. Cinétiques de production des nématicides et évolution de la biomasse (cellules viables) des bactéries *Variovorax paradoxus* (a), *Bacillus pseudomycoides* (b), *Paracoccus speluncae* (c), *Bacillus simplex* (d) et *Bacillus cereus* (e). 136
Figure 36. Cinétiques de production des nématicides des souches fongiques *Aspergillus terreus* (a), *Aspergillus ustus* (b) et *Paecilomyces lilacinus*(c). 138
Figure 37. Cinétique de la croissance de la biomasse fongique (mg/ml). 138
Figure 38. Spores de CMA observées sous un microscope optique à 400X. a : *Acaulospora* sp.1, b : *Glomus* sp.1, c : *Acaulospora* sp.2, d : *Rhizophagus* sp. e : *Glomus* sp.2 f : *Glomus* sp.3, g : *Funneliformis* sp. 140
Figure 39. Observation microscopique des structures mycorhiziennes au niveau des racines des porte-greffes d'agrumes *Citrange carrizo* et *Citrus aurantium* inoculées avec *Funneliformis mosseae* et *Rhizophagus irrigularis*. 141

Figure 40. Évaluation de l'effet de *Funneliformis mosseae* et *Rhizophagus irregularis*, sur la population finale de *Tylenchulus semipenetrans* dans le sol rhizosphérique (a) et dans les racines (b) sur le taux de réduction de cette population dans le sol rhizosphérique (c) et dans les racines (d) chez les porte-greffes d'agrumes *Citrus aurantium* et *Citrange Carrizo* 142
Figure 41. Effet des CMA, *Funneliformis mosseae* et *Rhizophagus irregularis*, sur l'allongement des pousses et des racines (a), la biomasse sèche des pousses et des racines (b), et sur le taux d'accroissement de la longueur aérienne et racinaire (c) et des biomasse aérienne et racinaire (d) chez les porte-greffes d'agrumes *Citrange carrizo* et *Citrus aurantium* inoculés (I) ou non (NI) avec *T. semipenetrans* et cultivés sous serre.. 144
Figure 42. Aspect de *T. semipenetrans* traité par l'huile essentielle de Romarin (a) et non traité (témoin) (b). 163
Figure 43. Éclosion des œufs de *Tylenchulus semipenetrans* après 48, 96 et 144 heures d'exposition aux huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales à des concentrations de 5, 10, 15 et 20 µl/ml..... 165
Figure 44. Chromatogramme HPLC de l'extrait de *R. officinalis*..... 166
Figure 45. Chromatogramme HPLC de l'extrait de *F. vulgare*. 167
Figure 46. Chromatogramme HPLC de l'extrait de *C. nobile* 168
Figure 47. Chromatogramme HPLC de l'extrait de *V. officinalis*..... 169
Figure 48. Chromatogramme HPLC de l'extrait de *L. nobilis*. 170
Figure 49. Chromatogramme HPLC de l'extrait de *M. oleifera*. 171
Figure 50. Éclosion des œufs de *Tylenchulus semipenetrans* après 48, 96 et 144 heures d'exposition aux extraits aqueux de plantes aromatiques et médicinales, à des concentrations de 1, 4, 8 et 10 %. 176
Figure 51. Schéma conceptuel des mécanismes impliqués dans l'influence des saisons, des pratiques agricoles (fertilisation, présence ou absence de cultures associées) sur la densité de NPP des agrumes. 192
Figure 52. Schéma conceptuel des mécanismes impliqués dans la résistance des porte-greffes d'agrumes contre le nématode *T. semipenetrans*. 195
Figure 53. Schéma conceptuel illustrant les mécanismes d'action déployés par les bactéries et les champignons mycorhiziens dans leur lutte contre *T. semipenetrans.* 198
Figure 54. Schéma conceptuel détaillant les mécanismes d'action des huiles essentielles (HEs) et des extraits aqueux (EA) des PAM, dans la lutte contre *T. semipenetrans in vitro* et *in vivo*. 201

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification de nématode des racines des agrumes *T. semipenetrans* cobb,1913 17
Tableau 2. Bionématicides homologués contre les nématodes des agrumes dans différents pays. 27
Tableau 3. Répartition des échantillons analysés par zone de prospection et par porte-greffe d'agrumes. 32
Tableau 4. Prévalence (%) des NPP des sols rhizosphériques (100 g) et de racines (20 g) des différentes régions agrumicoles étudiées. 43
Tableau 5. Intensité des NPP des sols rhizosphériques (100 g) et de racines (20 g) des différentes régions agrumicoles étudiées. 44
Tableau 6. Densité des NPP des sols rhizosphériques (100 g) et de racines (20 g) des différentes régions agrumicoles étudiées 45
Tableau 7. Numéro d'accession GenBank des nématodes identifiés. 46
Tableau 8. Diversité Shannon-Wiener (H'), Evenness (E) et nombre de NPP dans chacune des cinq régions d'agrumes étudiées. 49
Tableau 9. Texture, pH, humidité (H) et conductivité électrique (CE) des sols rhizosphériques des différentes régions agrumicoles étudiées. 50
Tableau 10. Teneurs en carbone organique total, matière organique, en éléments nutritifs et en calcaire des sols étudiés. 52
Tableau 11. Inventaire taxonomique de la nématofaune phytoparasite des agrumes. 64
Tableau 12. Densité des nématodes phytoparasites au niveau du sol (100 g) des agrumes dans différents sites de la région de Marrakech pendant les saisons de printemps, d'été et d'automne. 67
Tableau 13.Densité des nématodes phytoparasites au niveau de racines (10g) des agrumes dans différents sites de la région de Marrakech pendant les saisons de printemps, d'été et d'automne. 67
Tableau 14. Intensité des NPP au niveau du sol rhizosphérique (100 g) des agrumes dans différents sites de la région de Marrakech pendant les saisons de printemps, d'été et d'automne. 69
Tableau 15.Intensité des NPP au niveau de racines (10g) des agrumes dans différents sites de la région de Marrakech pendant les saisons de printemps, d'été et d'automne. 69
Tableau 16. Prévalence (Pr) des nématodes phytoparasites des agrumes dans différents sites de la région de Marrakech pendant les saisons de printemps, d'été et d'automne. 71
Tableau 17.Variation des propriétés physicochimiques des sols rhizosphériques des agrumes des différents sites prospectés en fonction des saisons. 74
Tableau 18. Population finale (Pf) de *T. semipenetrans* (Ts) dans 100g de sol rhizosphérique (Pfs) et par 10g de racines (Pfr) et facteur de reproduction de Ts dans le sol rhizosphérique (FRs) et dans les racines (FRr) chez les porte-greffes d'agrumes les plus utillisés au Maroc, Bigaradier, Bigaradier Australien, Citrange Troyer, Citrange Carrizo, Citrange C-35, Volkameriana et Macrophylla, inoculés avec *T. semipenetrans* et cultuvés sous serre. 87
Tableau 19. Nombre de femelles de *T. semipenetrans* (Ts) par cm de racines et type de réaction des porte-greffes d'agrumes les plus utilisés au Maroc, Bigaradier, Bigaradier Australien, Citrange Troyer, Citrange Carrizo, Citrange C-35, Volkameriana et Macrophylla, inoculés avec *T. semipenetrans* et cultivés sous serre. 88

Tableau 20. Effet de l'inoculation avec *T. semipenetrans* sur la masse fraîche (MFR) et sèche (MSR), la longueur (LR) et le diamètre (DR) des racines, sur la masse fraîche (MFPA) et sèche (MSPA) et la longueur (LPA) des parties aériennes et sur le nombre de branche(NB) chez les porte-greffes d'agrume les plus utilisés au Maroc, Bigaradier, Bigaradier Australien, Citrange Troyer, Citrange Carrizo, Citrange C-35, Volkameriana et Macrophylla inoculés ou non avec *T. semipenetrans* et cultivés sous serre. 90
Tableau 21. Teneur en proline, activités de la peroxydase, de la polyphénol oxydase et de la catalase, et accumulation de MDA chez les porte-greffes d'agrumes les plus utilisés au Maroc Bigaradier, Bigaradier Australien, Citrange Troyer, Citrange Carrizo, Citrange C-35, Volkameriana et Macrophylla, inoculés ou non avec *T. semipenetrans* et cultivés sous serre.92
Tableau 22. Séquences d'amorces pour l'amplification d'ADN bactérien et fongique. 107
Tableau 23. Composition du mélange réactionnel pour l'amplification de l'ADN bactérien. 107
Tableau 24. Composition du mélange réactionnel pour l'amplification de l'ADN fongique. 107
Tableau 25. Taux de Mortalité cumulé des juvéniles J2 de *T. semipenetrans* après72h d'incubation a une concentration de $3,6 \times 10^5$ Cellules/ml pour les bactéries et 10^8 Spores/ml pour les champignons. 112
Tableau 26. Caractéristiques morphologiques culturaux, microscopiques et biochimiques des isolats bactériens à activité nématicide contre *T. semipenetrans.* 113
Tableau 27. Caractéristiques macro et microscopiques des isolats fongiques à activité nématicide. 115
Tableau 28. Détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN extrait de chaque isolat bactérien en utilisant les ratios 260/280 (ADN/Protéines) et 260/230 (ADN/ARN). 117
Tableau 29. Origine et localisation géographique ainsi que le numéro d'accession GenBank des isolats identifiés. 118
Tableau 30. Aspect des œufs et des juvéniles de *T. semipenetrans* observés sous un microscope optique à 400X. A-B : œufs embryonnés colorés foncés (non viables) et non dégradés ; C: œuf non viable et dégradé ; D : œuf prêt à éclore mort ou non viable; E : œuf prêt à éclore coloré et dégradé ; F : œuf viable (clair) non coloré embryonné (Témoin) ; G, H, I, J, K : juvéniles non viables ; L: juvénile non traité (Témoin). 124
Tableau 31. Aspect des œufs et des juvéniles de *T. semipenetrans* observés sous microscope optique à 400X après traitement par les suspensions sporales fongiques. 128
Tableau 32. Diversité et abondance des spores de CMA au niveau des sols rhizosphériques au niveau des principales régions agrumicoles marocaines. 140
Tableau 33. Noms communs et scientifiques, les parties de la plante et la famille de plantes aromatiques et médicinales utilisées. 154
Tableau 34. Rendement et composition chimique (déterminée par des analyses GC-MS) des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* (RO), *Thymus vulgaris* (TV), *Laurus nobilis* (LC), *Verbena officinalis* (VO), *Foeniculum vulgare* (FV), *Moringa oleifera* (MO) et *Chamaemelum nobile* (CN). 158
Tableau 35. Pourcentage de mortalité des juvéniles de deuxième stade (J2) de *Tylenchulus semipenetrans* après incubation dans l'huile essentielle de plantes aromatiques et médicinales, *Rosmarinus officinalis, Thymus vulgaris, Laurus nobilis, Verbena officinalis, Foeniculum vulgare, Moringa oleifera* et *Chamaemelum nobile* à 5, 10,15 et 20 µl/ml pendant 24, 48, 72 et 96 heures. 162
Tableau 36. Doses létales de *T. semipenetrans* à 50% (DL50) et à 90% (DL90) des HEs des espèces de PAM étudiées. 163

Tableau 37. Identification et quantification des composés phénoliques de *R. officinalis* par analyse HPLC-DAD-ESI-MS. 166
Tableau 38. Identification et quantification des composés phénoliques de *F. vulgare* par analyse HPLC-DAD-ESI-MS. 167
Tableau 39. Identification et quantification des composés phénoliques de *C. nobile* par analyse HPLC-DAD-ESI-MS 168
Tableau 40. Identification et quantification des composés phénoliques de *V. officinalis* par analyse HPLC-DAD-ESI-MS. 169
Tableau 41. Identification et quantification des composés phénoliques de *L. nobilis* par analyse HPLC-DAD-ESI-MS. 170
Tableau 42. Identification et quantification des composés phénoliques de *M. oleifera* par analyse HPLC-DAD-ESI-MS. 171
Tableau 43. Pourcentage de mortalité des juvéniles de deuxième stade (J2) de *Tylenchulus semipenetrans* après incubation dans les extraits aqueux de plantes aromatiques et médicinales, *Rosmarinus officinalis, Thymus vulgaris, Laurus nobilis, Verbena officinalis, Foeniculum vulgare, Moringa oleifera* et *Chamaemelum nobile* à 1, 4, 8 et 10 % pendant 24, 48, 72 et 96 heures. 172
Tableau 44. Doses létales de *T. semipenetrans* à 50% (DL50) et à 90% (DL90) des extraits aqueux des espèces de PAM étudiées. 174
Tableau 45. Population initiale et population finale de *T. semipenetrans* dans le sol rhizosphérique et dans les racines, ainsi que le facteur de reproduction dans le sol rhizosphérique et dans les racines chez le porte-greffe d'agrume *Citrus volkameriana*, inoculés avec *T. semipenetrans* et cultivés sous serre. 177
Tableau 46. Effet de traitement par les extraits aqueux (EA) des PAM sur la masse fraîche (MFR) et sèche (MSR) et la longueur (LR) des racines, sur la masse fraîche (MFPA) et sèche (MSPA), la longueur (LPA) des parties aériennes et sur la longueur (LA) et le diamètre du tronc (DT) chez le porte-greffe d'agrume *Citrus volkameriana*, inoculés avec *T. semipenetrans* et cultivés sous serre. 178
Tableau 47. Augmentation (%) de la longueur racinaire (LR), de la masse fraîche (MFRA) et sèche (MSPA) des pousses de Citrus volkameriana. 179
Tableau 48. Diversité Shannon-Wiener (H'), Evenness (E) et nombre des NPP dans chacune des cinq régions d'agrumes étudiées. ..... **Error! Bookmark not defined.**
Tableau 49. Paramètres nématologiques (nombre de femelles de *T. semipenetrans* par cm de racines), physiologiques (activités CAT, PO, et PPO et accumulation de MDA) et type de réaction des porte-greffes d'agrumes les plus utilisés au Maroc, Bigaradier, Bigaradier Australien, Citrange Troyer, Citrange Carrizo, Citrange C-35, Volkameriana et Macrophylla, inoculés avec *T. semipenetrans* et cultivés sous serre. 195

TABLE DES MATIERES

RESUME III
ABSTRACT IV
ملخص V
ABREVIATIONS VI
LISTE DES FIGURES V
LISTE DES TABLEAUX VIII
INTRODUCTION GENERALE 1
CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 6
I. Données générales sur les agrumes : Biologie, Agroécologie et Répartition géographique 6
II. Importance socio-économique du secteur agrumicole 8
1. A l'échelle internationale 8
2. Au Maroc 8
III. Etat des lieux et stratégies du développement de l'agrumiculture Marocaine 9
IV. Nématodes 10
1. Généralites 10
2. Nématodes phytoparasites 11
3. Nématodes phytoparasites des agrumes 14
a. Tylenchulus semipenetrans 15
i. Historique et systématique 15
ii. Cycle biologique 18
iii. Ecologie de *T. semipenetrans* 20
V. Méthhodes de lutte contre le nématode des agrumes *T. semipenetrans* 21
1. Pratiques culturales 21
2. Méthodes physiques 21
3. Lutte chimique 22
4. Lutte biologique 23
CHAPITRE II. DIVERSITE DES NEMATODES PHYTOPARASITES ASSOCIES AUX AGRUMES AU NIVEAU DES CINQ PRINCIPALES REGIONS AGRUMICOLES DU MAROC 12
I. INTRODUCTION 30
II. MATERIEL ET METHODES 31
1. Sites d'étude 31
2. Echantillonnage……..…….……33
3. Analyses nématologiques 33
i. Nombre total de nématodes 35
ii. Indice de biodiversité shannon-winner 35
iii. Indice de biodiversité evenness 35
4. Caractérisations moléculaires des NPP 36
5. Analyses physico-chimiques du sol 37
a. pH eau 37
b. Conductivité électrique 37
c. Humidité du sol 37
d. Calcaire total 37
e. Carbone organique total 38
f. Phosphore assimilable 38
g. Azote total 39
h. Dosage de Na+, k+, Ca2+ et du phosphore total 39

6. Analyses statistiques 39
III. RESULTATS 40
1. Diversité taxonomique morphologique des NPP 40
2. Paramètres nématologiques 40
a. Densité totale 40
b. Prévalence 41
c. Intensité d'infestation 41
d. Densité maximale 42
3. Caractérisation moléculaire des NPP 46
4. Analyse de la diversité des nématodes phytoparasites 49
a. Diversité taxonomique 49
5. Caractérisation physico-chimique de sol 49
6. Interactions entre les parametres physico-chimiques et nematologiques de sol 53
IV. DISCUSSION 54
1. Distribution et diversité des NPP 54
2. Interaction entre les communautés de NPP et les facteurs physico-chimiques du sol 57
V. CONCLUSION 58
CHAPITRE III. EVALUATION DE LA VARIATION SAISONNIERE DES PRINCIPAUX NEMATODES PHYTOPARASITES ASSOCIES AUX AGRUMES DANS LA REGION DE MARRAKECH –SAFI 59
I. INTRODUCTION 59
II. MATERIELS ET METHODES 60
1. Site et période d'étude 60
2. Paramètres phytonématologiques 62
3. Paramètres physico-chimiques du sol 62
4. Analyses statistiques 62
III. RESULTATS 62
1. Inventaire taxonomique de la nématofaune phytoparasite des agrumes 62
2. Variation de la densité, l'intensité d'infestation et la prévalence des NPP en fonction des saisons et des sites prospectés 65
3. Variation des paramètres physicochimiques des sols étudiés en fonction des saisons et des sites 71
4. Corrélation entre les paramètres physicochimiques du sol, les saisons, et les paramètres nématologiques 75
IV. DISCUSSION 76
V. CONCLUSION 80
CHAPITRE IV. EVALUATION DE LA RESISTANCE DE CERTAINS PORTE-GREFFES D'AGRUMES AU NEMATODE *T. SEMIPENETRANS* 81
I. INTRODUCTION 81
II. MATERIEL ET METHODES 82
1. Matériel végétal 82
2. Inoculum de *T. semipenetrans* 82
3. Essai de la résistance variétale 83
4. Paramètres mesurés 83
a. Paramètres nématologiques 83
b. Paramètres agronomiques 84
c. Analyses biochimiques 84
i. Teneur en proline 84

ii. Extraction et dosage des activités enzymatiques des peroxydases et polyphénoloxydases 85
iii. Malondialdéhyde (MDA) 85
iv. Catalase (CAT) 86
5. Analyses statistiques 86
III. RESULTATS 86
1. Effet de l'inoculation par *T. semipenetrans* sur les paramètres nématologiques 86
2. Effet de l'inoculation par *T. semipenetrans* sur les paramètres agronomiques des plantes 88
3. Effet du *T. semipenetrans* sur les paramètres physiologiques et biochimiques 91
IV. DISCUSSION 93
V. CONCLUSION 96
CHAPITRE V. EVALUATION DU POTENTIEL NEMATICIDE DU MICROBIOME RHIZOSPHERIQUE DES AGRUMES 98
I. INTRODUCTION 98
II. MATERIEL ET METHODES 99
1. Collecte des échantillons de sols et de racines des agrumes 99
2. Isolement des bactéries et champignons rhizosphériques 100
a. Préparation des milieux d'isolement 100
b. Préparation d'homogénéisât 100
c. Préparation des différentes suspension-dilutions 100
d. Ensemencement et incubation 101
e. Purification des isolats bactériens et fongiques 101
f. Stockage et conservation des isolats bactériens et fongiques 101
3. Identification des isolats bactériens et fongiques 101
a.Identification morphologique et biochimique des bactéries nématicides 101
b. Identification morphologique des isolats fongiques 102
4. Préparation des inoculums bactériens et fongiques 103
a. Préparation de l'inoculum bactérien 103
b. Préparation de l'inoculum fongique 103
5. Préparation de l'inoculum du nématode *Tylenchulus semipenetrans* 104
6. Criblage sélectif des microorganismes nématicides 104
a. Activité nématicide *in vitro* 104
b. Activité nématicide *in vivo* 105
7. Caractérisation moléculaire des isolats bactériens et fongiques ayant une importante activité nématicide 106
8. Cinétique de croissance et activité nématicide des filtrats bactériens et fongiques 109
9. Isolement, identification morphologique et préparation des inoculums des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) 109
a. Isolement et dénombrement des spores des CMA 109
b. Identification morphologique des souches de CMA 110
c. Préparation des inoculums des CMA 110
d. Evaluation de la mycorhization naturelle 110
10. Activité nématicide des CMA 111
11. Analyses statistiques 111
III. RESULTATS 111
1. Isolement et screening de l'activité nématicide des isolats 111
2. Caractérisation des isolats bactériens ayant une activité nématicide 113

a. Caractéristiques morphologiques, microscopiques et biochimiques des isolats bactériens à activité nématicide..... 113
3. Identification morphologique des isolats fongiques à activité nématicide 114
4. Caractérisation moléculaire des antagonistes bactériens et fongiques..... 116
5. Effet de la concentration des isolats fongiques et bactériens et du temps d'incubation sur leur activité nématicide *in vitro*..... 120
a. Effet des bactéries sur la mortalité des juvéniles..... 120
b. Effet des bactéries sur l'éclosion des œufs..... 122
c. Effet des isolats fongiques sur la mortalité des juvéniles J2 de *T. semipenetrans* ... 125
d. Effet des isolats fongiques sur l'éclosion des œufs..... 126
6. Activité nématicide *in vivo*..... 128
a. Effet des isolats bactériens sur les paramètres phytonématologiques..... 128
b. Effet des isolats fongiques sur les paramètres phytonématologiques 130
c. Effet des isolats bactériens sur les paramètres agronomiques des plantes 131
d. Effet des isolats fongiques sur les paramètres agronomiques des plantes 132
7. Cinétique de l'activité nématicide des filtrats de cultures liquides bactériennes et fongiques, en conjonction avec la cinétique de croissance bactérienne et fongique associée……..……133
a. Étude de la cinétique de l'efficacité nématicide des filtrats issus de cultures liquides bactériennes testées ainsi que la cinétique de la croissance bactérienne associée……..……133
b. Étude de la cinétique de l'activité nématicide des filtrats issus de cultures liquides fongiques conjointement avec la cinétique de croissance des champignons associée ……..……137
8. Distribution et caractérisation morphologique des spores de champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) 139
9. Effet de CMA sur *T. semipenetrans*..... 141
a. Analyse de la mycorhization des porte-greffes d'agrumes 141
b. Effet des CMA sur les paramètres phytonématologiques 141
c. Effet des CMA sur les paramètres agronomiques des plantes..... 142
V. CONCLUSION 151
CHAPITREVI. EVALUATION DU POTENTIEL NEMATICIDE DE CERTAINES PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES..... 154
I. INTRODUCTION 153
II. MATERIEL ET METHODES .....
1. Matériel végétal..... 154
2. Préparation de l'inoculum de *T. semipenetrans*..... 154
3. Extraction des huiles essentielles et détermination de leur composition chimique par GC-MS…….. 154
4. Préparation des extraits aqueux des PAM et détermination de leur composition chimique par HPLC-MS 155
5. Activité nématicide *in vitro* des HEs et des extraits aqueux 156
6. Activité nématicide *in vivo*…… 157
7. Analyses statistiques 157
III. RESULTATS 157
1. Rendement et profils chimiques des huiles essentielles..... 157
2. Activité nématicide des HEs contre *T. semipenetrans*..... 161
a. Effet des HEs sur la mortalité des juvéniles J2 161
b. Dose létale à 50 % (DL50) et 90 % (DL90) des HEs..... 163

c. Effet des HEs sur l'éclosion des œufs 164
3. Composition chimique des extraits aqueux 165
4. Activité nématicide des extraits aqueux contre *T. semipenetrans* 172
a. Effets des extraits aqueux sur la mortalité des juvéniles J2 172
b. Dose létale à 50 % (DL50) et à 90 % (DL90) des extraits aqueux 173
c. Effet des extraits aqueux sur l'éclosion des œufs de *T. semipenetrans* 174
d. Activité nématicide des extraits aqueux *in vivo* 176
i. Effet des extraits sur les paramètres phytonématologiques 176
ii. Effet des extraits sur les paramètres agronomiques de *Citrus volkameriana* 177
IV. DISCUSSION 179
V. CONCLUSION 184
CHAPITREVII. SYNTHESE GENERALE 186
1. Distribution et diversité des nématodes phytoparasites 186
2. Interaction entre la distribution des communautés des nématodes phytoparasites et les facteurs physico-chimiques du sol 188
3. Évaluation de la variation saisonnière des principaux nématodes phytoparasites associés aux agrumes dans la région de Marrakech –Safi 189
4. Évaluation de la résistance de certains porte-greffes d'agrumes au nématode *T. semipenetrans* 193
5. Évaluation du potentiel nématicide du microbiome rhizosphériques des agrumes 196
6. Évaluation du potentiel nématicides de certaines Plantes Aromatiques et Médicinales 198
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 202
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 208
ANNEXES I

INTRODUCTION GENERALE

Citrus spp. (*Rutaceae*) est l'une des principales cultures fruitières dans plus de 140 pays à travers le monde (Lv *et al*., 2015), il constitue également une importante marchandise horticole échangée à l'échelle mondiale (Matheyambath *et al*., 2016). Parmi les espèces d'agrumes, les oranges (*Citrus* sinensis) occupent la majorité de la production mondiale d'agrumes (55%), suivies des mandarines (*Citrus reticulata*) (25%), des citrons (*Citrus limon*) (13%) et des pamplemousses (*Citrus grandis*) (7%) (Global Citrus Outlook, 2019). En outre, les arbres d'agrumes jouissent d'une importance capitale du point de vue écologique et socio-économique pour les régions tropicales et subtropicales (Agustí *et al*., 2014). Au Maroc, l'agrumiculture s'étend sur 128 000 ha environ avec une production de 2,4 millions de tonnes, dont 644 000 tonnes ont été réservées à l'exportation, ce qui représente une valeur ajoutée de plus de 4,8 milliards de dirhams (Ministère de l'Agriculture, 2019). Le Maroc est ainsi classé 1er au niveau des pays du Maghreb et 4ème au niveau mondial (FAOSTAT, 2021) dans la production des petits agrumes tels que les mandarines, clémentines et tangerines (FAOSTAT, 2021). En outre, le secteur agrumicole marocain contribue à la création de 21 millions de journées de travail annuellement, dont 12 millions dans les vergers et 9 millions dans la transformation et la distribution (ADA, 2019). Les agrumes jouent également un rôle écologique indéniable en offrant un habitat et une source de nourriture pour de nombreux organismes, tels que les pollinisateurs et les oiseaux, qui se nourrissent de leurs fleurs, nectar et fruits (Halder *et al*., 2019; Barberis *et al*., 2023).

Malgré ce bilan très encourageant, le rendement moyen national (9,7 T/ha) demeure faible en comparaison avec d'autres pays producteurs des agrumes autour du monde comme les États-Unis, le Brésil et la Chine (FAOSTAT, 2021) où le rendement moyen est estimé à environ 19,3 T/ha (FAO, 2019). En effet, cette filière est confrontée à plusieurs contraintes d'ordre biotiques et abiotiques qui limitent sa productivité. Parmi ces contraintes, les plus proéminents sont les nématodes phytoparasites qui existent en abondance dans la rhizosphère des agrumes et qui peuvent leur infliger des dégâts colossaux. En effet, plus de Soixante-dix espèces appartenant à 37 genres de nématodes phytoparasites ont été identifiées dans la rhizosphère des agrumes (Reddy and Singh, 2009), dont les plus nuisibles sont *Tylenchulus semipenetrans*, *Xiphinema index*, X. *brevicolle*, *X. diversicaudatum* , *Paratrichodorus lobatus*, *Pratylenchus brachyurus*, *P. vulnus*, *P. coffeae Hemicycliophora arenaria*, *H. nudata*, *Longidorus ferrisi*, *Meloidogyne javanica*, *M. citri*, *M. mingnanica*, et *M. arenaria* (Zhang and Xu, 1994 ; Robbins

et al., 2009 ; Mokrini *et al*., 2014 ; Kumar and Das, 2019 ; Yüksel *et al*., 2023). Chaque année, l'infestation des agrumes par ces nématodes phytoparasites entraîne une perte de production estimée à environ 119,7 millions de dollars (Kumar *et al*., 2020). Parmi ces nématodes, *T. semipenetrans*, responsable du dépérissement lent 'slow decline' des agrumes, est particulièrement préoccupant en raison de sa présence abondante dans toutes les régions productrices d'agrumes du monde, y compris le Maroc (Verdejo-Lucas and McKenry, 2004 ; Mokrini *et al*., 2018a). Cette maladie a été observée dans plusieurs régions du monde tel que l'Australie (Walker and Morey, 1999), les États-Unis (O'Bannon *et al*., 1972), les pays européens (Sorribas *et al*., 2008), l'Inde (Bhagawati *et al*., 2021), la Chine (Ruiz *et al*., 2023), aisni que dans plusieurs pays d'Afrique du Nord, dont la Tunisie (Labiadh *et al*., 2019) et l'Algérie (Scotto la Massése *et al*., 1975). Les dégâts énormes causés par *T. semipenetrans*, qui causent une baisse importante de la quantité et de la qualité de la production, sont dues au mode d'alimentation semi-endoparasitique de ce nématode. En effet, selon le degré d'infestation, les pertes de rendement due à *T. semipenetrans* peuvent varier entre 10 et 30% (Duncan and Cohn 1990), soit l'équivalent de 11,97 millions de dollars par an. Les pertes réelles de rendement pourraient même être plus élevées à cause du manque de données dans de nombreux pays où l'expertise en nématologie fait défaut. De plus, en raison de l'absence de symptômes visibles au-dessus du sol, les pertes de rendement dues aux nématodes sont souvent négligées et/ou attribuées à d'autres contraintes (Siddique and Grundler, 2018).

T. semipenetrans a été détecté pour la première fois au Maroc par Vilardebo (1964) et sa présence dans les vergers d'agrumes nationaux a été confirmée par la suite par Mokrini *et al*. (2018). Hormis ces deux travaux, on ne trouve dans la littérature aucune autre étude qui s'est intéressées aux nématodes des agrumes, particulièrement à *T. semipenetrans* au Maroc. Les dégâts causés par ce nématode, comme mentionné précédemment, nécessitent d'abord une actualisation des données concernant le degré d'infestation des vergers d'agrumes nationaux par ce phytoparasite, ainsi qu'une sensibilisation des agriculteurs et des acteurs du secteur aux dangers que représentent ces phytoparasites. De plus, il est primordial de développer des méthodes de lutte biologique respectueuses de l'environnement, en évitant l'utilisation de nématicides organophosphorés et carbamatés qui sont nuisibles pour l'homme et l'écosystème (Chen *et al*. 2020).

Il est actuellement bien admis que l'utilisation de porte-greffes résistants peut constituer une méthode efficace pour protéger les agrumes contre les attaques et les dommages causés par le nématode *T. semipenetrans*. Ces porte-greffes peuvent induire des réactions

d'hypersensibilité qui empêchent l'entrée de nématodes dans les racines des plantes, réduisant ainsi les dommages causés par ces parasites (Kallel *et al*., 2006). Les études menées dans ce domaine se sont principalement intéressées aux porte-greffes *Poncirus trifoliata* et Forner-Alcaide 5 (Verdejo-Lucas *et al*., 2023a). Cependant, les agrumes marocains, constitués presque exclusivement d'orangers et de clémentines, sont principalement greffés sur le Bigaradier (*Citrus aurantium*), *Citrus volkameriana*, *Citrus macrophylla* et les Citranges (Carrizo, Troyer et Citrange C-35) (Mohammed *et al*., 2015; Benyahia *et al*., 2017). Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour étudier le comportement de ces porte-greffes vis-à-vis du nématode *T. semipenetrans* et déterminer leur niveau de résistance à ce parasite. L'effet des porte-greffes résistants peut être amélioré s'ils sont associés à des cultures de couverture, permettant à la fois une gestion plus efficace des nématodes et une économie d'eau d'irrigation pouvant atteindre 20% (Zerhoune *et al*.2021).

L'intégration d'antagonistes microbiens (bactériens, fongiques, et mycorhiziens) indigènes, ainsi que l'utilisation de produits naturels ayant une activité nématicide, tels que les extraits de plantes aromatique et médicinales (extraits aqueux ou huiles essentielles), peut constituer une méthode efficace pour lutter contre le nématode des agrumes *T. semipenetrans*. De nombreuses espèces végétales, appartenant à 57 familles différentes, dont les *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae* et *Lauraceae*, contiennent des composés nématicides (Kepenekci *et al*., 2016). L'application de ces plantes en tant que cultures associées ou sous forme d'extraits dans des sols contaminés par des nématodes peut affecter directement la population de nématodes phytoparasites ou stimuler les microbes du sol pour réduire leur nombre (Ahmad *et al*., 2004)

En combinant ces différentes approches, en commençant par la sélection variétale, en l'associant à des cultures associées à capacité nématicide (PAM) et en introduisant des antagonistes microbiens indigènes, il est possible de développer une approche prometteuse et complète pour la gestion durable des NPP dans les vergers d'agrumes. Par ailleurs, l'étude de l'efficacité de ces différentes méthodes pour lutter contre le nématode des agrumes *T. semipenetrans* est peu documentée. Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse est de développer des méthodes de lutte biologique contre le nématode des agrumes *T. semipenetrans*. Cet objectif se décline en deux sous-objectifs. Le 1er consiste à étudier la répartition géographique des NPP dans les cinq principales régions agrumicoles nationales, et leur dynamique en fonction des saisons et des conditions agronomiques (porte-greffes, cultures associées, paramètres physico-chimiques). Le 2 ^{ème} sous-objectif porte sur la recherche d'outils

biologiques pour lutter contre le nématode des agrumes *T. semipenetrans*. Il s'agit de : 1) sélectionner les variétés porte-greffes résistantes à ce nématode, 2) explorer le potentiel nématicide des microorganismes rhizosphériques (bactéries, champignons, CMA) des agrumes, et 3) évaluer l'efficacité de certaines plantes aromatiques et médicinales (toxicité des extraits aqueux/huiles essentielles) dans la lutte contre *T. semipenetrans*.

Pour atteindre ces objectifs, nous tenterons de répondre aux questions suivantes :

1. Les vergers agrumicoles marocains sont-ils infestés par les NPP et à quel degré ? Comment sont distribués les NPP à travers les régions agrumicoles marocaines ? et quels sont les principaux facteurs gouvernant cette distribution ?
2. Les variations saisonnières et les pratiques culturales impactent-elles la diversité et la distribution des NPP dans le sol et leur capacité à infester les racines des agrumes ? Cet impact s'exercerait-il à travers l'action sur les propriétés physico-chimiques du sol ?
3. Les porte-greffes d'agrumes utilisés au Maroc sont-ils résistants ou sensibles à *T. semipenatrans* ? Est-il possible que certains d'entre eux puissent être utilisés comme moyen de lutte biologique dans la stratégie de gestion de ce nématode ?
4. Quelle est la structure du microfilme associé à la rhizosphère des agrumes ? Existe-t-il des microorganismes spécifiques dotés d'activité nématicide contre *T. semipenetrans* ? ? Et est-ce que certains d'entre eux pourraient être exploités comme une modalité de lutte biologique dans la stratégie de gestion de *T. semipenetrans* ?
5. Les extraits de PAM (EA/ HEs) peuvent-ils constituer un outil biotechnologique durable pour lutter contre *T. semipenetrans* ? Existe-t-il des variations significatives dans l'efficacité nématicide entre les différentes plantes testées ? Existe-t-il une relation entre la composition chimique des huiles essentielles et des extraits et leur efficacité nématicide ?

Les réponses à ces interrogations dans les travaux actuellement publiés dans des revues internationales indexées (Web of Science) et à l'avenir apporteront une contribution importante et précieuse à la communauté scientifique nationale (première étude de ce genre) et internationale pour la gestion de ce phytoparasite.

Cette thèse est constituée de 6 chapitres organisés comme suite :

Chapitre I : consacré à une synthèse bibliographique présentant les données générales sur les agrumes, notamment leur biologie, écologie, répartition géographique et sur l'importance socio-économique du secteur agrumicole à l'échelle nationale et internationale. Ce chapitre

établit également un diagnostic sur l'état des lieux de la filière des agrumes au Maroc et discute des stratégies de développement de l'agrumiculture marocaine. La deuxième partie de cette revue bibliographique est consacrée aux nématodes phytoparasites des agrumes, en particulier *T. semipenetrans*, et aux différentes méthodes de lutte utilisées : méthodes physiques, chimiques et biologiques (porte-greffes résistants, bactéries, champignons, champignons mycorhiziens arbusculaires et plantes aromatiques et médicinales).

Chapitre II : Ce chapitre a pour objectif l'étude de la distribution et la répartition géographique des nématodes phytoparasites associés aux cultures des agrumes au niveau des cinq principales régions agrumicoles nationales. Les résultats de ce chapitre ont donné lieu à une publication :

- **ZOUBI, B.**, MOKRINI, F., DABABAT, A. A., AMER, M., GHOULAM, C., LAHLALI, R., LAASLI, S.-E., KHFIF, K., IMREN, M., AKACHOUD, O., BENKEBBOURA, A., HOUSSEINI, A. I., and QADDOURY, A. (**2022)**. Occurrence and Geographic Distribution of Plant-Parasitic Nematodes Associated with Citrus in Morocco and Their Interaction with Soil Patterns. **Life**, 12(5), 637.

Chapitre III : Ce troisième chapitre concerne l'étude de la variation saisonnière de la population de nématodes phytoparasites associés aux agrumes dans la région de Marrakech - Safi.

Chapitre IV : Ce quatrieme chapitre concerne l'évaluation de la resistance de certains porte greffes d'agrumes au nématode *Tylenchulus semipenetrans.* Les résultats de ce chapitre ont donné lieu à une publication :

- **ZOUBI, B.**, MOKRINI, F., RAFYA, M., BENKEBBOURA, A., AKACHOUD, O., GHOULAM, M., KRIF, G., HOUSSEINI, A. I., and QADDOURY, A. (**2024)**. Citrus rootstocks vs. nematodes: A battle for resistance against *Tylenchulus semipenetrans*. **Scientia Horticulturae** 331, 113115.

Chapitre V : Ce chapitre porte sur l'évaluation du potentiel nématicide des microorganismes rhizosphériques (bactéries, champignons, CMA) des agrumes.

Chapitre VI : Ce chapitre concerne l'évaluation du potentiel nématicide de certaines plantes aromatiques et médicinales (huiles essentielles et/ou extrait aqueux) contre le nématode *Tylenchulus semipenetrans*. Il comprend deux publications :

- **ZOUBI, B.**, MOKRINI, F., AMER, M., CHERKI, G., RAFYA, M., BENKEBBOURA, A., AKACHOUD, O., LAASLI, S.E., HOUSSEINI, A. I., LAHLALI, R., and QADDOURY, A. (**2023**). Eco-friendly management of the citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans* using some aromatic and medicinal plants. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, 56(1), 66-86.
- **ZOUBI, B.**, MOKRINI, F., GHOULAM, C., IRAQI HOUSSEINI, A., and QADDOURY, A. (**2023**). The efficiency of *Thymus vulgaris* against citrus nematode

Tylenchulus semipenetrans. **Journal of Analytical Sciences and Applied Biotechnology**, 5(1), 5-1.

Chapitre IV : Ce chapitre discute et confronte les résultats des différents chapitres de cette thèse.

Enfin, une liste de toutes les références bibliographiques mentionnées dans ce manuscrit est proposée à la fin du manuscrit.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. DONNEES GENERALES SUR LES AGRUMES : BIOLOGIE, AGROECOLOGIE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Les agrumes appelés aussi hespéridés sont des arbres qui appartiennent à la famille des *Rutaceae*, ils se répartissent principalement en trois genres cultivés : *Fortunella*, *Poncirus* et *Citrus* (Swingle, 1943). Le genre *Citrus* est le plus connu et le plus important, vu qu'il regroupe la majorité des fruits comestibles et commercialement importants (Tamokou *et al*., 2017). Le genre *Citrus* s'est structuré autour de 4 taxons originaires d'Asie de l'est. Le cédratier (*Citrus medica*), le pamplemoussier (*Citrus maxima*), le mandarinier (*Citrus reticulata* Blanco), et le Micrantha (*Citrus micrantha).* Ces espèces seraient à l'origine de nombreuses espèces connues de nos jours, regroupées sous les appellations : orangers, bigaradiers, citronniers, pomelos (Barkley *et al*, 2006).

Les agrumes sont des petits arbres d'environ 4 à 12 m de hauteur avec un feuillage d'un vert généralement très foncé, dense, et persistant à l'exception de quelques variétés hybrides dont les feuilles sont caduques ou semi-persistantes (Fra *et al*., 2009). Les fleurs, de 1,5 centimètres de long et groupées par 2-3 à l'aisselle des feuilles, sont d'un blanc pur, très odorantes et à saveur aromatique. Les fruits des agrumes se caractérisent par une diversité morphologique importante. Avec des formes qui peuvent être rondes, oblongues ou aplaties. Cependant, tous les fruits des *Citrus* cultivés présentent la même structure anatomique correspondant à une baie plus au moins sphérique, multiloculaire, et composés de deux parties distinctes : le péricarpe ou écorce qui représente la partie nom comestible du fruit, et la pulpe ou endocarpe qui correspond à la partie comestible du fruit. Les *Citrus* sont des fruits constitués de plusieurs segments, dont le nombre varie entre les espèces. Ces segments proviennent d'un seul ovaire et contiennent des sacs à jus riches en pigments, sucres et citrates. (Dugrand-Judek, 2015).

Les arbres d'agrumes sont composés de deux parties : une partie souterraine formée par le porte-greffe qui assure à la fois l'ancrage de l'arbre au sol ainsi que son alimentation en eau et en sels minéraux, et une partie aérienne constituée par la variété (**Figure 1**). Cette dernière porte les fruits et constitue la partie productive de l'arbre (Barboni, 2006).

Les plantules d'agrumes issues de germination des graines possèdent une phase juvénile relativement longue, généralement entre 5 à 8 ans, avant d'être capables d'émettre des fleurs et produire des fruits (Iglesias *et al*., 2007).

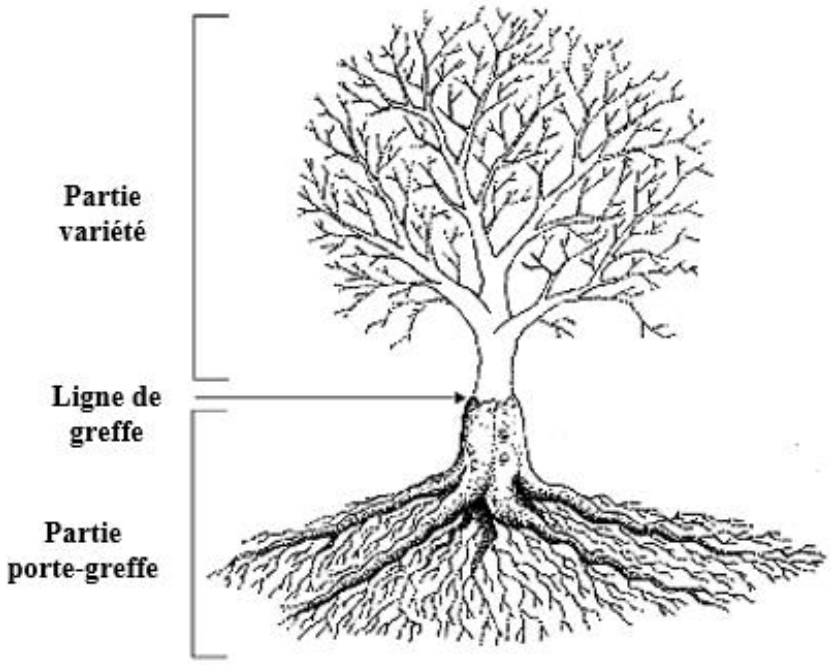


Figure 1. Shéma d'un arbre d'agrumes greffé (Jacquemond *et al*. 2013)

Les agrumes sont très sensibles aux basses températures (inférieures à 0°C). Cependant ils peuvent supporter des températures élevées, supérieures à 30°C, à condition qu'ils soient bien approvisionnée en eau (Loussert, 1985). La température moyenne annuelle favorable pour la culture des agrumes est de l'ordre de 14°C. La température admise comme zéro de végétation pour les agrumes est de 12,8°C (Praloran 1968).

L'agrumiculture fait partie des cultures qui demandent des quantités élevées en eau. Les besoins annuels varient entre 1200 à 1500 mm, dont 600 mm pendant l'été. D'où la nécessité des apports d'eau (irrigation) pour combler le déficit dans les régions où les précipitations sont inférieures à 600 mm par an (Bertin *et al.*, 1993). Un approvisionnement déficitaire en eau met la culture sous stress hydrique pouvant impacter négativement le rendement et la qualité de la production (Maatala *et al*., 2018).

Les agrumes préfèrent les sols dont le pH est compris entre 6 et 7 (Loussert, 1985), à texture dominante grossière et à drainage satisfaisant, les sols trop argileux, trop lourds ou très limoneux ne conviennent pas à cette culture (Walali Loudyi *et al*., 2003).

II. IMPORTANCE SOCIO-ECONOMIQUE DU SECTEUR AGRUMICOLE

1. À l'échelle internationale

A l'échelle de la production fruitière mondiale, la production agrumicole (161,8 Mt) occupe la deuxième place après la production de bananes (170,3 Mt) (FAO, 2021). La Chine, le Brésil, les États-Unis, l'Inde, le Mexique, et l'Espagne sont les pays qui dominent le secteur des agrumes produisant environ deux tiers de la production mondiale (Liu *et al*., 2012). La surface mondiale réservée à la culture des agrumes est d'environ 10,2 millions d'hectares, produisant en moyenne 161,8 Mt millions tonnes par an dont les oranges (76,57 millions de tonnes), les mandarines (41,95 millions de tonnes), les citrons et les limes (20,83 millions de tonnes) et les pamplemousses (9,56 millions de tonnes) sont les plus récoltés (**Figure 2**) (FAO, 2021; Gonzatto *et al.* 2023).

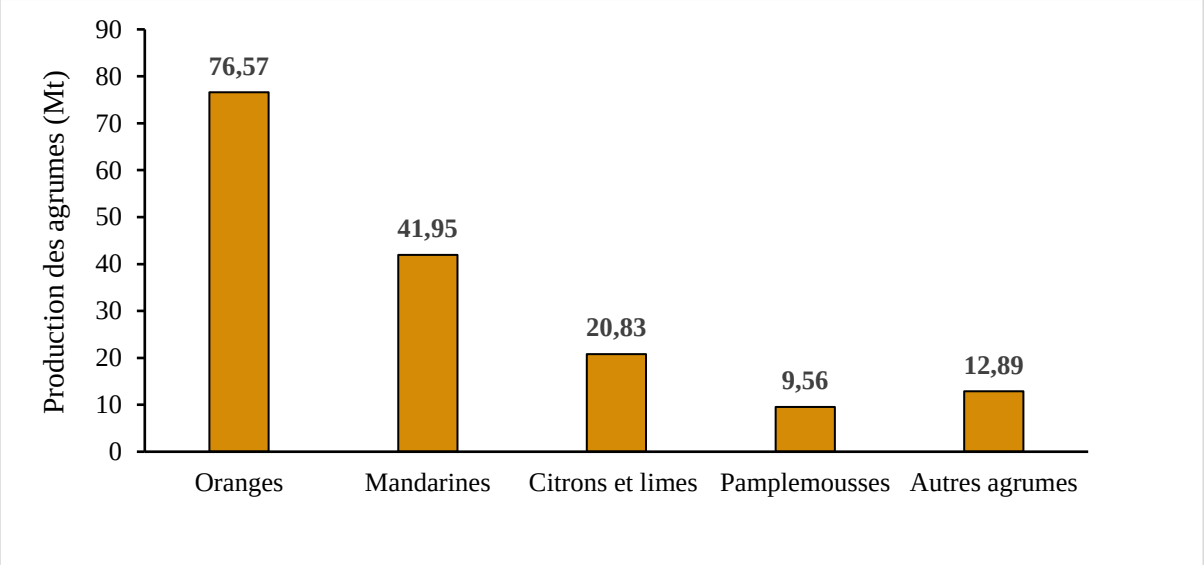


Figure 2. Production mondiale des principaux groupes d'agrumes commercialisés (FAO, 2021).

2. Au Maroc

Au Maroc, la filière des agrumes joue un rôle socio-économique remarquable, d'où son classement parmi les secteurs piliers de l'économie agricole nationale. Ces deux dernières décennies, la filière agrumicole nationale a connu un épanouissement important grâce aux efforts déployés dans le cadre du Plan Maroc Vert. En effet, la superficie de l'agrumiculture s'est élevée aux environs de 128 000 hectares (ha) avec une production moyenne de l'ordre de 3 millions de T/an (Mechchate, *et al*., 2021). Au niveau économique et social, l'importance des

agrumes marocains n'est plus à démontrer. En effet, les exportations des agrumes estimées à environ 700 000 T génèrent des revenus d'environ 4 milliards de DH par an (Ministère de l'agriculture, 2019). En outre, le secteur agrumicole marocain assure plus de 20 millions de journées de travail par an pour environ 50 000 ouvriers (Hadria et *al*., 2019)

III. ETAT DES LIEUX ET STRATEGIES DU DEVELOPPEMENT DE L'AGRUMICULTURE MAROCAINE

La filière agrumicole Marocaine a connu une croissance significative entre 2008 et 2019, aussi bien en termes de surface de culture qu'en termes de production. La superficie consacrée à la culture des agrumes a augmenté de 52%, passant de 84 000 à 128 000 hectares (Ministère de l'Agriculture, 2019). La production a également connu une amélioration notable, avec une augmentation de 84%. En moyenne, entre 2015 et 2019, la production annuelle d'agrumes était d'environ 2,4 millions de tonnes, contre 1,3 million de tonnes seulement entre 2003 et 2007. Les exportations d'agrumes ont également augmenté de 22%, atteignant une moyenne annuelle de 644 000 tonnes au cours des quatre dernières années. La filière agrumicole est ainsi devenue la deuxième source des exportations agricoles du Maroc et offre des perspectives prometteuses en termes de développement économique et de création d'emplois (Ministère de l'Agriculture, 2019). Cependant, le secteur agrumicole national est confronté à plusieurs contraintes qui entravent son potentiel de croissance à savoir l'irrégularité des précipitations aggravée par les changements climatiques globaux et l'inadéquation des infrastructures d'irrigation qui affectent le rendement et la qualité de la production (Bensbahou *et al*., 2020). C'est ainsi que dans certaines régions du royaume, le rendement des agrumes a chuté de 22.000 à 15.000 tonnes par hectare en 2021-2022 et jusqu'à 8.000 tonnes à l'hectare pour la campagne 2022-2023 (ASPAM, 2023). De même, la lutte contre les maladies et les ravageurs représente un défi majeur pour la filière agrumicole, en particulier la mouche méditerranéenne des fruits (*Ceratitis capitata*) qui est capable d'engendrer des pertes économiques considérables, atteignant des millions de dollars chaque année (Benmessaoud *et al*., 2021; Khfif *et al*., 2022). De plus, l'infestation des agrumes par les nématodes phytoparasites et leur association à d'autres pathogènes tels que le *Fusarium* et le *Phytophthora* causent également des pertes économiques considérables qui s'élèvent à environ 34 millions de dollars (Duncan, 2009; Ezrari *et al*., 2022). Malheureusement, les agriculteurs ne sont pas toujours conscients de l'ampleur de ces parasites sur leurs cultures, en particulier des nématodes phytoparasites, ce qui peut compromettre leur gestion efficace. Les infrastructures post-récolte, telles que le conditionnement, le stockage et le transport, doivent être améliorées pour réduire

les pertes dues au pourrissement, aux dommages mécaniques et aux variations de température (la chaîne du froid). Les normes de qualité et les exigences des marchés internationaux ajoutent une pression supplémentaire aux producteurs d'agrumes marocains (Aloui and Kenny, 2005). Pour surmonter ces défis et favoriser le développement durable de la filière agrumicole, le Maroc a lancé en 2008 le Plan Maroc Vert (PMV). Cette stratégie nationale avait pour objectif de moderniser et dynamiser le secteur agricole dans son ensemble, y compris la filière agrumicole. Des mesures spécifiques ont été mises en place pour soutenir la filière agrumicole, en mettant l'accent sur la durabilité environnementale, la compétitivité économique et l'amélioration des conditions de vie des agriculteurs. Tout d'abord, des investissements et subventions importantes ont été déployés pour moderniser les infrastructures d'irrigation en adoptant des technologies plus efficaces telles que l'irrigation goutte à goutte. En 2018, le secteur agrumicole affichait un taux d'équipement en goutte à goutte supérieur à 80%, atteignant près de 100% dans certaines régions telles que la région de Souss-Massa (Ministère de L'agriculture, 2018). De plus, des efforts ont été entrepris pour améliorer les infrastructures post-récolte, incluant le conditionnement, le stockage et le transport, afin de réduire les pertes et de maintenir la qualité des produits. De même, un intérêt particulier a été accordé à la diversification des marchés d'exportation et à valorisation industrielle des agrumes à travers l'incitation au développement des produits à plus forte valeur ajoutée (jus, huiles essentielles, produits transformés, et autres produits dérivés à base d'agrumes) afin d'augmenter l'offre exportable, notamment dans le cadre du contrat-programme de l'agro-industrie (2017-2022) (Ministère de L'agriculture, 2018). En parallèle à ces mesures importantes en faveur du développement et la croissance de la filière agrumicole, le Maroc a encouragé la recherche scientifique dans ce domaine à travers la mise en place et le financement des programmes de recherche et de développement, notamment en matière d'amélioration génétique pour développer des variétés et porte-greffes d'agrumes adaptés aux conditions marocaines. Dans ce sens, l'INRA a développé plusieurs variétés de mandarines telles que la Mahdia (2009), la Gharbaoui (2010), la Maamora (2011), la Hana (2015) et l'Aya (2015).

IV. NEMATODES

1. Généralités

Les nématodes (Némathelminthes) ou "vers ronds", forment un groupe zoologique d'organismes vermiformes à symétrie bilatérale recouverts d'une cuticule souple mais très résistante. Ils sont dépourvus de membres et de squelette et ont la forme d'un fuseau. Cependant chez certaines espèces le corps de la femelle adulte peut prendre une structure plus arrondie et sphérique (Ali, 2015). La majorité des nématodes telluriques sont de taille microscopique

mesurant entre 0,6 et 0,8 mm de longueur et 0,025 à 0,5 mm de diamètre (Sumenkova, 1989), mais certains comme les *Longidoridae* peuvent atteindre 4 mm de longueur (Coyne *et al*., 2010). Un examen du sol à l'œil nu ne permet donc pas de les observer et sont par conséquent largement inconnus du grand public, quoiqu'ils sont ubiquistes et les plus abondants dans le sol après les protozoaires. En effet, les nématodes occupent des niches écologiques très diversifiées, ils sont rencontrés au niveau de toutes les latitudes, sous les différents climats, dans les différents types de sols, dans les eaux continentales et dans les eaux océaniques (salées et douces) (Ali 2015).

Les nématodes telluriques se trouvent généralement dans les couches superficielles du sol (horizon A). Mais peuvent également se trouver dans les zones de prospection racinaire plus profonde, notamment chez les espèces ligneuses (Ali 2015).

De point de vue taxonomique, le phylum des nématodes est l'un des plus grands du règne animal (Lee, 2002). En effet, environ 27 000 espèces ont été décrites à ce jour. Cependant, un grand nombre d'espèces, estimé entre 300 000 à 500 000 espèces, reste encore à décrire (Hugot *et al*., 2001). Les nématodes sont les organismes les plus abondants dans le sol après les protozoaires. Leur densité peut aller de 100 à 1000 individus par gramme de sol, ce qui représente entre 1 et 30 millions d'individus par mètre carré de sol, soit une biomasse d'environ 1-30 g/m^2 (Floyd *et al*., 2002). Les nématodes ont des régimes alimentaires très diversifiés. Certains, sont bactériophages, mycophages, saprophages, zooparasites, et phytoparasites, alors que d'autres sont prédateurs d'invertébrés (Yeates *et al*., 1993). D'un point de vue écologique, les nématodes bactérivores et omnivores sont particulièrement importants pour leur capacité à réguler la croissance des populations de pathogènes. Ils jouent un rôle essentiel dans le cycle des éléments minéraux, notamment le cycle du carbone et de l'azote, et dans la dégradation de la matière organique (Ingham *et al*., 1985; Ferris *et al*., 2004; Briar *et al*., 2007).

2. Nématodes phytoparasites

Les nématodes phytoparasites (NPP) se trouvent généralement dans le sol ou à l'intérieur des cellules végétales racinaires, caulinaires, parfois foliaires, voire même dans les semences. Ils sont caractérisés par la présence d'une pièce buccale spécialisée : le stylet. Il s'agit d'un organe creux qui ressemble fortement à une aiguille hypodermique (**Figure 3**), qui sert à perforer les cellules végétales et à y injecter des enzymes lytiques afin d'en extraire la sève végétale, de manière similaire aux aphidés (pucerons) (Coyne *et al*., 2010).



Figure 3. Nématode phytoparasite des agrumes *T. semipenetrans*.
A : forme général ; B : stylet (Photo originale). Grossissement 400 X.

En fonction de leur stratégie parasitaire, on distingue les nématodes ectoparasites, endoparasites, ou semi-endoparasites. Le stylet peut également avoir une forme et une longueur différente chez ces trois types de nématodes. En effet, les ectoparasites possèdent des stylets longs et fins pour piquer les cellules végétales et atteindre la sève depuis l'extérieur de la racine, tandis que les endoparasites ont plutôt recours à des stylets courts et robustes pour détruire mécaniquement les cellules végétales et pénétrer la racine.

La diversité des nématodes, qui s'élève à près de 27 000 espèces répertoriées à l'heure actuelle, peut s'expliquer par plusieurs facteurs :

- Ils ont trois origines évolutives distinctes (Blaxter *et al*. 1998)
- Ils ont des modes trophiques variés.
- Ils peuvent parasiter les plantes en se nourrissant de leur tissus et en limitant leur croissance en pratiquant différents modes parasitaires: ectoparasites, semi-endoparasites (migrateurs/sédentaires) ou endoparasites (migrateurs/sédentaires) (Siddiqi, 2000).
- Ils ont la capacité de se reproduire par amphimixie, parthénogenèse et hermaphrodisme (Perry and Moens, 2013).

Les nématodes phytoparasites sont répartis dans trois clades (I, II et IV) et classés dans 4 ordres : Les *Dorylaimida*, *Triplonchida*, *Aphelenchida* et les *Tylenchida* (**figure 4**). Ce dernier regroupe les NPP qui causent le plus de dégâts sur les végétaux. Il est composé de 9

familles dont la famille des *Tylenchulidae* qui contient le nématode *T. semipenetrans*, auquel nous allons accorder plus d'attention puisque c'est le nématode parasite le plus important sur agrumes.

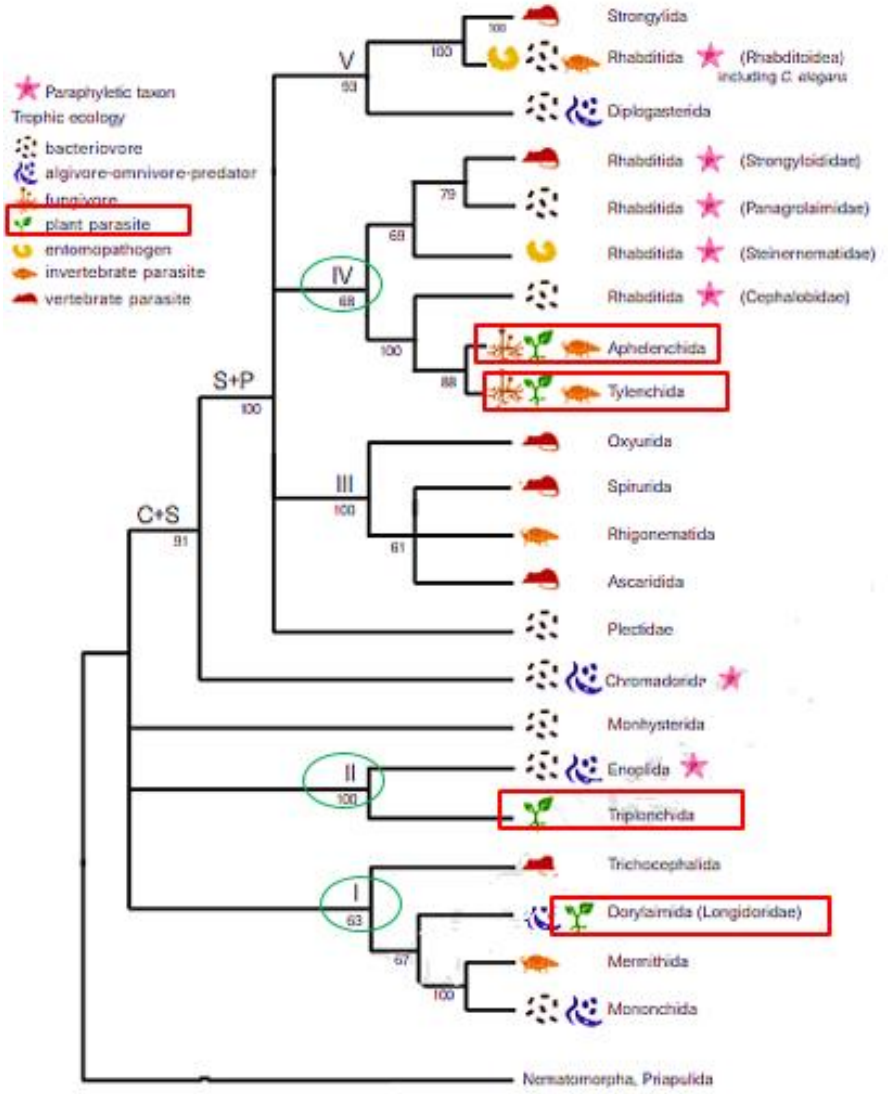


Figure 4. Phylogénie du phylum des nématodes (Blaxter *et al*. 1998).

Les nématodes phytoparasites peuvent attaquer différentes cultures, y compris les cultures céréalières, maraîchères, florales et fruitières (Djian-Caporalino *et al*., 2009). Ils se nourrissent des cellules végétales, en particulier des cellules racinaires, détruisant ainsi les racines et entraînant une dégradation de leurs fonctions vitales, notamment la capacité à absorber l'eau et les nutriments, se traduisant par une perte de vigueur et de productivité de la plante. Les blessures racinaires causées par ces phytoparasites constituent également une porte d'entrée facilitant la pénétration d'autres champignons et bactéries phytopathogènes (*Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*) et de certains

virus (Powell, 1971), entraînant des pertes importantes de rendement et de qualité des produits agricoles. Globalement, les dégâts occasionnés par les nématodes phytoparasites s'élèvent à environ 60% de la production agricole mondiale (Nicol et al., 2015), représentant des pertes annuelles de récoltes estimées à plusieurs millions de tonnes (Agrios, 2005). Face à ces impacts agronomiques et économiques considérables, il est impératif d'élaborer des stratégies permettant la gestion et la maîtrise de la propagation de ces parasites. Par ailleurs, les producteurs ne sont pas enclins à soupçonner que les NPP sont la cause des dégâts observés, d'autant plus que les NPP n'induisent généralement pas de symptômes spécifiques. En outre, le contrôle de ces parasites est ardu, car ils sont enfermés dans le sol ou à l'intérieur des tissus végétaux, et leurs capacités physiologiques variées leur permettent d'adapter leurs défenses voire même devenir résistant à de nombreuses méthodes de lutte.

3. Nématodes phytoparasites des agrumes

Les agrumes sont cultivés, sur des arbres greffés, sous les climats méditerranéens et subtropicaux (Verdejo-Lucas and McKenry, 2004). Ils sont confrontés à une combinaison de contraintes d'ordre abiotiques tels que les vents chauds et secs, le gel, les fortes quantités d'eau, la sécheresse, la salinité, et l'alcalinité des sols (Dambier *et al*., 2011; Nehela and Killiny, 2020) et biotiques tel que les maladies virales, bactériennes, cryptogamiques, les ravageurs et les nématodes. La bibliographie relative aux ennemis des agrumes, entraînant des pertes économiques considérables dans de nombreuses régions agrumicoles du monde, révèle l'importance de nombreuses espèces et genre de NPP associées à la rhizosphère des agrumes tels que *Radopholus similis, Tylenchulus semipenetrans, Meloidogyne* spp, *Pratylenchus* spp, *Criconema* spp, *Hemicriconemoides* spp, *Tylenchorhynchus* spp., *Rotylenchus* spp., *Helicotylenchus* spp., *Longidorus* spp., *Trichodorus* spp. *et Xihinema* spp., (Van Gundy and Meagher, 1977; Pretorius *et al*., 2002; Ibrahim *et al*., 2010). Les infestations peuvent atteindre 60% des vergers agrumicoles de par le monde, notamment aux Etats–Unis d'Amérique (Keshari *et al*., 2022), au Brésil, en Espagne (Shokoohi and Duncan, 2018a), et dans différents pays méditerranéens (Mokrini *et al*., 2018a ; Abd-Elgawad, 2020).

Parmi ces NPP, *T. semipenetrans* est largement connu comme l'une des espèces les plus menaçantes pour les agrumes dont l'importance des dégâts varie en fonction des conditions environnementales et édaphiques (Parvez *et al*., 2003). Ce semi-endoparasite, qui attaque les racines causant la maladie de dépérissement lent des agrumes, est largement distribué dans le monde entier, et particulièrement dans le bassin méditerranéen. Les pertes de rendement dues

à *T. semipenetrans* sont de l'ordre de 10 à 30 % selon le niveau d'infection (Verdejo-Lucas *et al*., 2004). Le développement des symptômes dépend des conditions générales de la culture. Les symptômes en surface comprennent le rabougrissement, la croissance lente, le jaunissement, la réduction de la taille des arbres et la perte de la productivité (Bélair, 2005). En ce qui concerne les symptômes souterrains, les racines nourricières lourdement infectées par le nématode sont légèrement plus épaisses et ont un aspect sale en raison de l'adhérence des particules de sol à la matrice gélatineuse déposée par la femelle à la surface de la racine. Les dommages causés par le nématode au système racinaire nuisent à la capacité de l'arbre à absorber l'eau et les nutriments nécessaires à une croissance normale, les dégâts deviennent plus intenses lorsque d'autres contraintes sont présentes, tels que les infections par d'autres parasites fongiques et/ou bactériens. Les dommages causés varient selon le niveau d'infestation qui fait référence à la destruction graduelle et à la détérioration conséquente de l'arbre. Les arbres matures peuvent tolérer un grand nombre de ces nématodes avant que les symptômes apparaissent (Duncan, 2005).

a. Tylenchulus semipenetrans

i. Historique et systématique

T. semipenetrans (**Figure 5**) est une espèce cosmopolite de la famille des *Tylenchulidae* (**Tableau1**), originaire de l'Extrême-Orient. Il a été découvert pour la première fois en Californie (Thomas, 1913). Plus tard, Nathan Cobb (1913) a décrit ce nématode comme une nouvelle espèce, *Tylenchulus semipenetrans*, qui a ensuite été identifiée comme l'agent causal du slow décline des agrumes (Vilardebo and Luc, 1961). Depuis sa découverte, *Tylenchulus semipenetrans* a été retrouvée dans toutes les régions agrumicoles du monde (**Figure 6**) (Duncan, 2005). Ce nématode attaque également d'autres plantes cultivées comme la vigne, l'olivier, le kaki, et le lilas (Thorne, 1962; Baines *et al*., 1969).

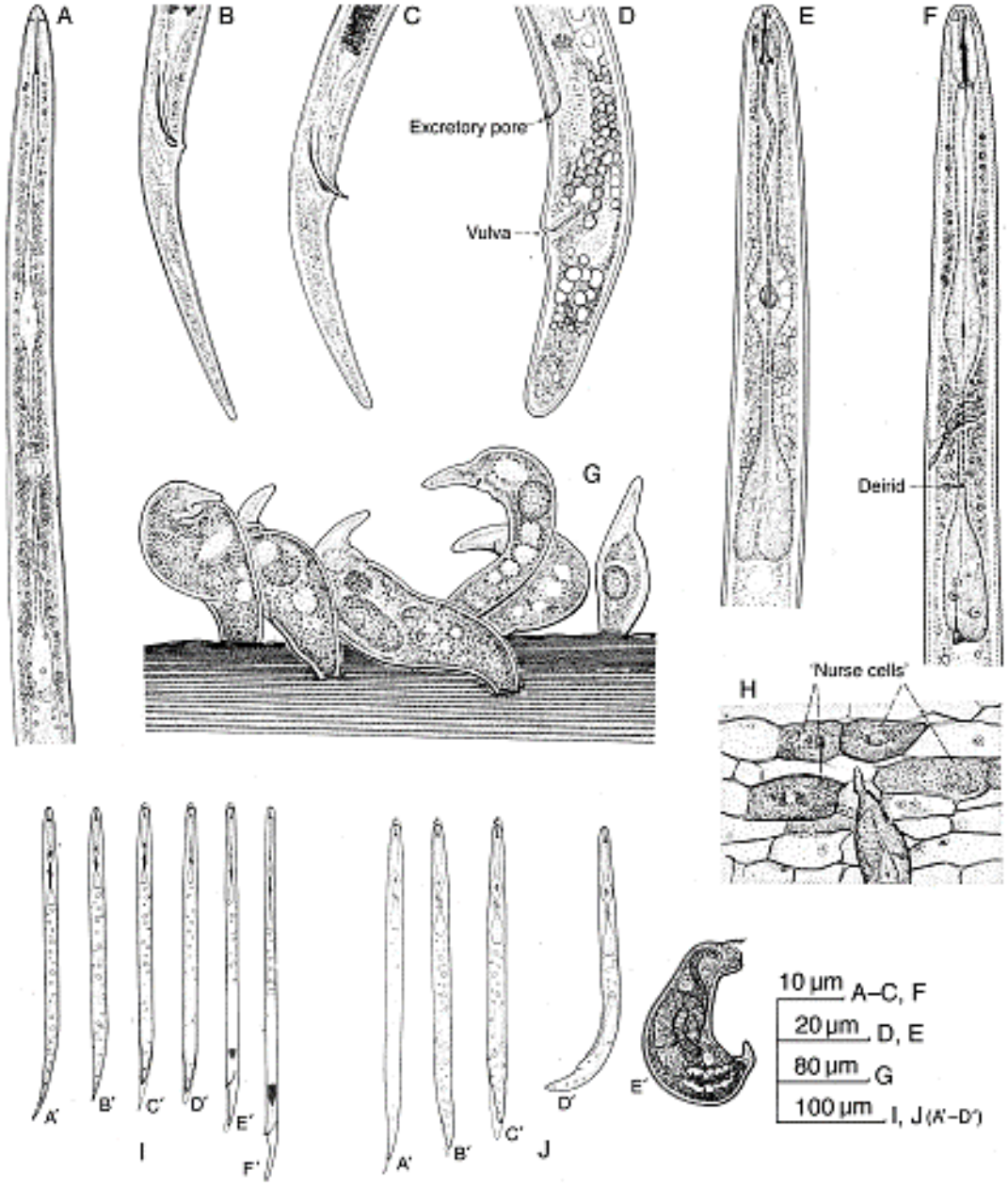


Figure 5. *T. semipenetrans* cobb. A. L'œsophage du mâle. B et C queues du mâle. D et E la queue et œsophage de la femelle immature. F. œsophage de J2. G. femelles attachées aux racines des agrumes. H. Cellules nourricières. I et J stade de développements de mâle et de femelle (Siddiqi, 2000).

Tableau 1. Classification de nématode des racines des agrumes *T. semipenetrans* cobb,1913

Domaine	Biota
Règne	Animalia
Sous-Règne	Eumetazoa
Clade	Bilateria
Infra-Règne	Protostomia
Phylum	Nematoda
Classe	Chromadorea
Sous-Classe	Tylenchida
Sous-Ordre	Criconematina
Super-Famille	*Tylenchuloidea*
Famille	*Tylenchulidae*
Genre	*Tylenchulus*
Espèce	*Tylenchulus semipentrans* Cobb, 1913

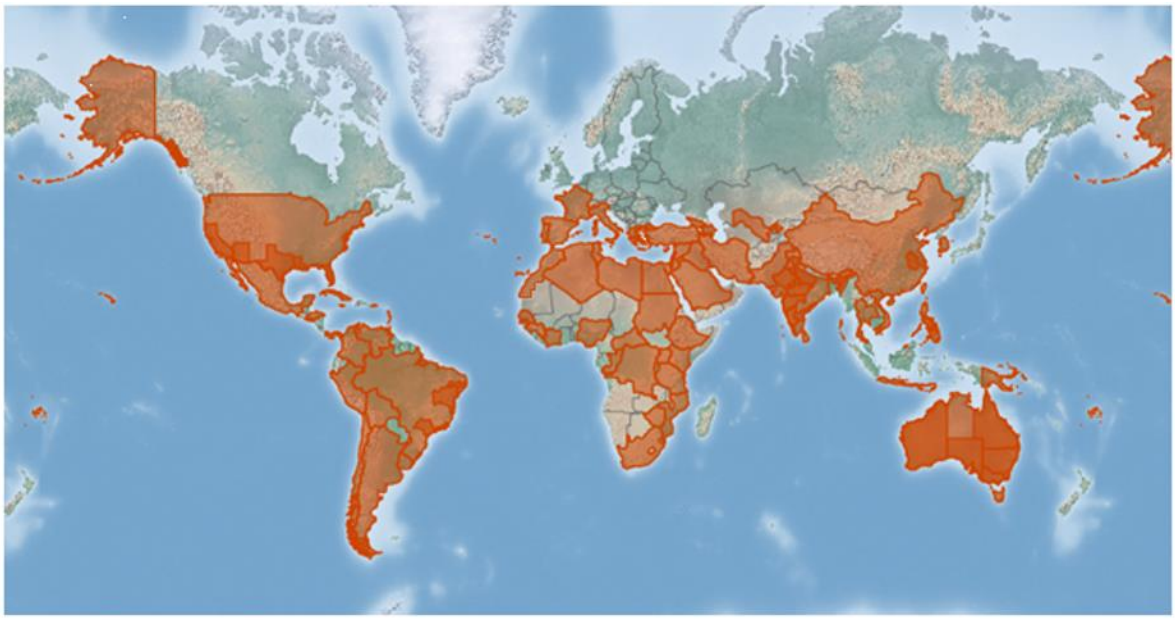


Figure 6. Distribution de *Tylenchulus semipenetrans (CABI, 2021).*

ii. Cycle biologique

Tylenchulus semipenetrans est une espèce dimorphe qui présente un dimorphisme sexuel accentué à la fois au stade juvénile et au stade femelle adulte (Duncan, 2000).

La femelle mature de *T. semipenetrans* est attachée à la racine de l'arbre. La partie antérieure du corps s'insère entre les cellules du parenchyme radiculaire, alors que la partie postérieure reste à l'extérieur de la racine (**Figure 7**). Les œufs sont déposés sur une couche gélatineuse recouvrant la zone postérieure et éclosent dans le sol. Les larves qui en sortent ont déjà subi une mue à l'intérieur de l'œuf comme il est de règle chez le groupe *Tylenchida* auquel appartient cette espèce. Après ce stade, l'œuf commence à se transformer pour passer au deuxième stade juvénile (J2), puis commence à chercher des racines hôtes pour se nourrir (Pretorius and Le Roux, 2017). Le stade J2, mobile et vermiforme, se transforme en J3 et J4, et finalement se transforme en adulte sédentaire (**Figure 8**). Le développement des femelles juvéniles en adultes nécessite de se nourrir de l'épiderme et des couches superficielles du parenchyme cortical des racines. La femelle immature commence d'abord par pénétrer la surface externe de la racine visant les couches corticales profondes, généralement sans atteindre le cylindre central (ou exceptionnellement l'endoderme). Elle devient alors sédentaire en établissant un site d'alimentation permanent constitué de cellules spécialisées. Avec la maturation, la partie postérieure de son corps gonfle et fait saillie à la surface des racines, alors que la partie antérieure reste enfoncée dans le cortex (Vilardebo and Luc, 1961).

Le cycle de vie dure de 6 à 8 semaines à des températures entre 24 et 26ºC (Duncan, 2009). Les femelles adultes déposent de 75 à 100 œufs dans une matrice gélatineuse sur la surface de la racine (Pastor Audi *et al*., 2005). Le développement embryonnaire dure de 12 à 14 jours pour donner lieu au premier stade juvénile qui mue en deuxième stade juvénile (J2), qui émerge de l'œuf. C'est à ce moment que la différenciation des sexes se produit ; le J2 mâle se développe pendant les premiers 7 jours sans se nourrir, et le J2 femelle nécessite environ 14 jours pour infecter la racine. Pendant ce temps, il se nourrit des cellules superficielles des jeunes racines. Par la suite, il pénètre partiellement dans la racine, et établit un site d'alimentation constitué de 4 à 6 cellules nourricières autour de la région céphalique, moment où il devient sédentaire et subit trois mues supplémentaires pour donner lieu au stade de femelle adulte

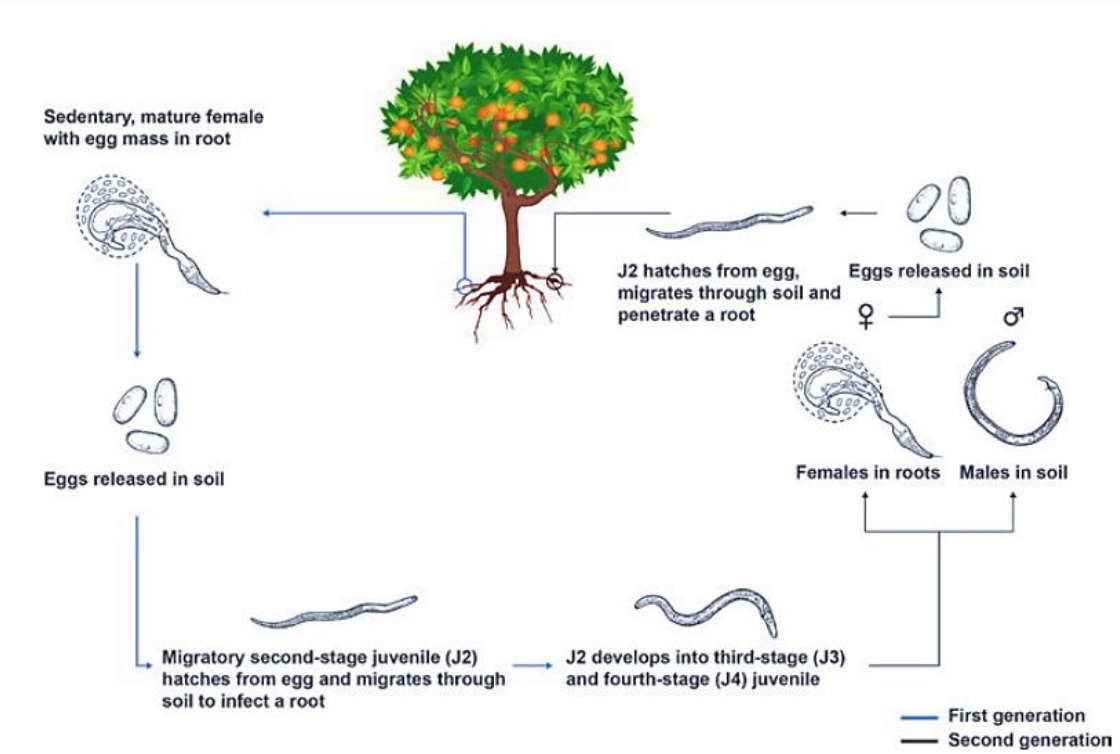


Figure 7. Cycle de vie de *T. semipenetrans* (Pretorius and Le Roux 2017).

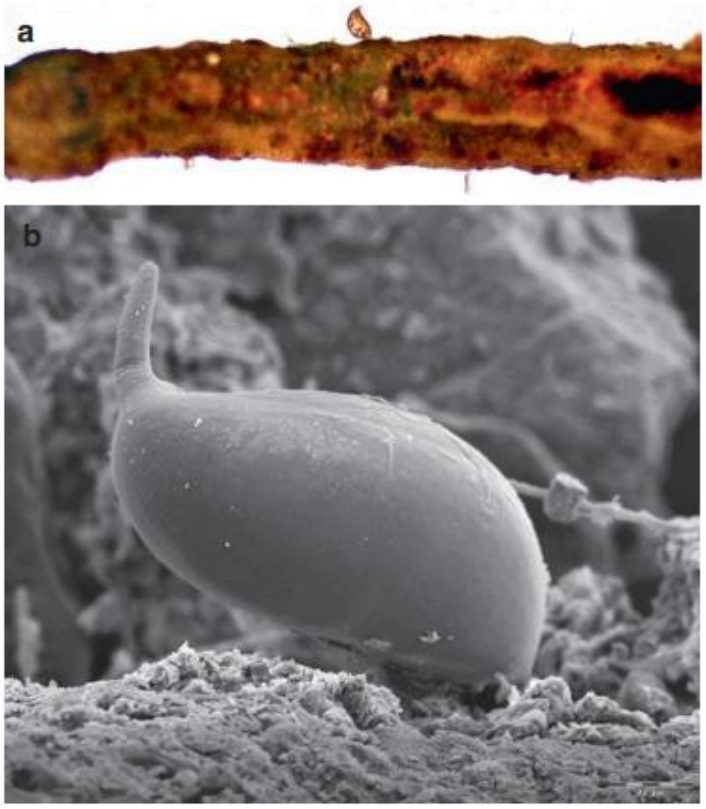


Figure 8. Partie postérieure du corps de femelle de *T. semipenetrans* à l'extérieur de racine des agrumes où elle se nourrit. (a) microscope à dissection, (b) microscope électronique à balayage (Pretorius and Le Roux 2017).

iii. Ecologie de *T. semipenetrans*

L'écologie de *T. semipenetrans* est fortement influencée par sa coévolution étroite et prolongée avec les agrumes. Cette coévolution a conduit à une relation parasitaire très spécialisée entre *T. semipenetrans* et les agrumes (CABI, 2021). Dans cette relation, *T. semipenetrans* infecte les racines des agrumes, où il se nourrit et se reproduit. Les agrumes, en retour, ont développé diverses stratégies pour tolérer la présence du nématode, bien que cela puisse souvent entraîner un déclin de la santé de l'arbre. Cette coévolution a conduit à ce que *T. semipenetrans* ait une gamme d'hôtes très limitée - il infecte principalement les agrumes et peu d'autres plantes.

T. semipenetrans a adapté son mode de vie pour tirer le meilleur parti de sa relation avec les agrumes.

- ✓ **Structure des cellules infirmières très développée** : Les cellules infirmières sont des cellules spéciales formées dans les racines de l'hôte par le nématode. Ces cellules fournissent des nutriments au nématode et sont essentielles à sa survie et à sa reproduction (Jaiman *et al*., 2022).
- ✓ **Nombre exceptionnellement élevé de nématodes supportés par les arbres** : Même lorsque les arbres présentent un déclin léger à modéré, ils peuvent supporter un grand nombre de ces nématodes (Reynolds and O'bannon, 1963).
- ✓ **Survie en l'absence de racines hôtes** : Les juvéniles de *T. semipenetrans* peuvent survivre sans racines hôtes pendant une période allant de plusieurs mois à des années, en fonction de la température (Baines, 1950), sans pour autant épuiser leurs réserves lipidiques nécessaires à leur motilité et à leur infection (Van Gundy *et al*., 1967).

T. semipenetrans est particulièrement sensible à la salinité, au pH et à la température du sol. Il prospère idéalement dans des conditions où le pH du sol varie entre 6 et 8 (Shokoohi and Duncan, 2018), et lorsque la température est comprise entre 20°C et 30°C, avec un optimum à 25°C (O'bannon *et al*., 1966). Cependant, ce nématode a du mal à survivre dans les sols secs. En effet, on observe une diminution rapide de sa population sur les arbres stressés par la sécheresse (Tsai and Van Gundy, 1989, Sorribas *et al*., 2000).

V. METHODES DE LUTTE CONTRE LE NEMATODE DES AGRUMES *T. SEMIPENETRANS*

Des méthodes variées ont été mises en place pour contrôler le nématode des agrumes *T. semipenetrans*, notamment des pratiques culturales (utilisation des porte greffes résistants, cultures associées, etc.), des méthodes physiques (solarisation des sols et/ou désinfection à la vapeur), biologiques (utilisation d'antagonistes microbiens et des extraits de plantes), et des méthodes chimiques (application des nématicides).

1. Pratiques culturales

Plusieurs pratiques culturales peuvent être utilisées pour limiter les populations de *T. semipenetrans :*

Exclusion : Cette approche emploie des techniques préventives telles que la culture dans des sols vierges ou non infestés et l'irrigation avec de l'eau non infestée (Ghaderi and Hosseinvand, 2022).

Incorporation d'amendements organiques au sol : L'ajout d'acide humique au sol est une approche efficace pour la gestion de *T. semipenetrans* (Ennab, 2016). Cet amendement peut non seulement améliorer la structure du sol et augmenter sa capacité de rétention d'eau et de nutriments, favorisant ainsi la croissance des plantes et les rendant moins susceptibles aux infestations de nématodes, mais aussi stimuler la biodiversité microbienne dans le sol (Abd-Elgawad, 2020). En effet, certains de ces microbes peuvent être antagonistes des nématodes, contribuant ainsi à contrôler leurs populations.

Gestion de l'irrigation : Une bonne gestion de l'irrigation contribuerait à limiter la propagation des nématodes, car les excès d'eau facilitent leur dissémination (Djian-Caporalino *et al*., 2009).

2. Méthodes physiques

Il existe plusieurs techniques physiques efficaces et plus respectueuses de l'environnement pour lutter contre les NPP en générale et donc contre *T. semipenetrans* aussi. Il s'agit de méthodes impliquant un processus hydrothermal qui consiste à augmenter la température du sol pour le désinfecter des phytopathogènes soit par solarisation (couvrir le sol saturé d'eau avec un plastique fin et transparent) (Djian-Caporalino *et al*., 2009) soit par injection de vapeur d'eau à 45 °C pendant environ 25 minutes à une profondeur de 25

cm contribuant ainsi à réduire la densité de *T. semipenetrans* dans le sol sans effet néfaste sur les agrumes (Kim *et al*., 2022).

Cependant, en raison de leurs modes d'application, des gros moyens financiers et matériels qu'elles nécessitent et des faibles surfaces qu'elles peuvent concernées, ces techniques ne peuvent s'appliquer aux vergers des agrumes.

3. Lutte chimique

La lutte chimique contre le nématode *T. semipenetrans*, basée sur l'application des produits nématicides industriels, reste la méthode la plus employée. Elle consiste à traiter les cultures en place avec des produits systémiques qui seront véhiculés par la sève ce qui permet de contrôler les NPP. En effet, Les nématicides organophosphorés et carbamates, tels que Rugby et Cartap, sont particulièrement efficaces (Choudhary *et al*., 2023). Ces produits chimiques désactivent l'enzyme acétylcholinestérase, perturbant ainsi le système nerveux du nématode (Hammam *et al*., 2016). D'autres produits chimiques, comme le Lufenuron (également connu sous le nom de Match), suppriment la production de chitine, empêchant ainsi la larve de *T. semipenetrans* de développer une enveloppe externe dure (Hammam *et al*., 2016). L'Oxamyl est un autre produit chimique utilisé pour supprimer la population de *T. semipenetrans* (Sorribas *et al*., 2008; Khalil *et al*., 2018). Le Carbofuran est également utilisé pour contrôler la population de *T. semipenetrans*, réduisant sa population jusqu'à 55,60% et augmentant le rendement en fruits jusqu'à 33,27% (Nagachandrabose *et al*., 2022). Enfin, l'Azadirachtine et l'Acide Humique sont également utilisés pour contrôler *T. semipenetrans* en les délivrant par une méthode d'irrigation goutte à goutte dans la racine et le sol de la plante (Nagachandrabose *et al*., 2022). L'utilisation d'Ozone en association avec du sulfate de cuivre ou du sulfate de calcium peut également servir à réguler la population de *T. semipenetrans*. Ces deux combinaisons, à savoir Ozone + CuSO4 et Ozone + CaSO4, permettent non seulement de réduire la population de *T. semipenetrans*, mais aussi d'améliorer le rendement et la valeur nutritionnelle de l'arbre à citron, tout en augmentant le diamètre et le poids du fruit (Abdel-Sattar and Hammad, 2022).

Cependant, malgré qu'elles sont plus efficaces et plus simples à utiliser, les nématicides de synthèse sont progressivement interdits à cause de leurs effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement (résidus dans les denrées alimentaires, pollution des sols et des nappes phréatiques, etc.) (Zhao *et al*., 2023). En plus, leurs actions sont de courte durée et

leur utilisation répétées affectent considérablement le prix de revient de la récolte et risque de provoquer l'apparition d'espèces résistantes (Desaeger *et al*., 2020).

4. Lutte biologique

Les conséquences dommageables des nématicides sur la santé humaine et l'environnement ont été largement documentées, d'où la nécessité de chercher des produits naturels pour contrôler les NPP, protéger les cultures et maintenir les rendements. Actuellement, la culture des agrumes fait face à un double défi: résoudre les divers problèmes de gestion agronomique et répondre à l'augmentation de la demande en fruits aux attributs sensoriels améliorés et exempts de résidus agrochimiques. Pour atteindre cet objectif, des stratégies de gestion respectueuses de l'environnement doivent être mises en œuvre. Dans le but d'apporter une solution efficace et durable aux problèmes des nématodes, plusieurs alternatives ont été mises en œuvre afin d'éradiquer ces ravageurs ou de minimiser leur densité. Il s'agit de l'utilisation de porte-greffes résistants, de microorganismes antagonistes (bactéries, champignons, champignons mycorhiziens, etc), ou de traitement par des nématicides d'origine biologiques (extraits de plantes, huiles essentielles, etc).

a. Utilisation de porte-greffes résistants

L'utilisation des porte-greffes résistants offre une alternative précise et efficace pour la lutte biologique contre *T. semipenetrans*. Ils représentent une solution durable pour les agriculteurs et les producteurs, et peuvent aider à réduire les coûts de production associés aux traitements avec des nématicides chimiques (Abd-Elgawad, 2020). Leur mode de fonctionnement est assez simple, ils attirent ces phytoparasites des couches profondes grâce à leurs exsudats racinaires puis les bloquent à l'intérieur de la racine par une réaction d'hypersensibilité, due à l'expression d'un gène de résistance, qui entraine la mort spontanée et localisée des cellules racinaires autour des nématodes. Cette réaction est soit précoce et empêche la migration des larves profondément dans la racine, les privant donc de nourriture ; soit tardive et prévient le développement du site nourricier nécessaire au développent et à la prolifération des nématodes (Djian-Caporalino *et al*., 2009). Parmi les porte-greffes ayant été démontrés résistants au *T. semipenetrans* on cite le *Citrange Carrizo* (Castillo *et al*., 2017), Forner-Alcaide 5 (Verdejo-Lucas *et al*., 2023b), Certaines sélections de *Poncirus trifoliata* et le porte-greffe hybride Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* × *P. trifoliata*) *(*Verdejo-Lucas *et al*., 2003; Uludamar *et al*., 2021). Cependant, Il est important de noter que l'utilisation continue de porte-greffes résistants peut conduire au développement de nouvelles populations de

nématodes qui sont capables de surmonter cette résistance (Verdejo-Lucas *et al*., 2003). Par conséquent, il est crucial de surveiller régulièrement les populations de nématodes et d'adapter les stratégies de gestion en conséquence pour assurer une lutte antiparasitaire durable et efficace.

b. Utilisation des microorganismes telluriques

Pour une gestion durable de *T. semipenetrans*, la recherche explore l'utilisation de microorganismes telluriques, comme les bactéries, les champignons et les CMA. Ces organismes montrent un potentiel significatif pour la régulation biologique de *T. semipenetrans*, offrant une solution respectueuse de l'environnement pour contrôler ces parasites.

i. Champignons

Certains Champignons (mycètes) ont développé plusieurs tactiques pour s'attaquer aux différents stades de développements des NPP, à la fois mobiles et sédentaires. Des structures spécifiques, comme des anneaux de constriction, des réseaux d'hyphes tridimensionnels et des spores adhésives, sont utilisées pour capturer les nématodes et les empêcher de s'évader (Jiang *et al*., 2017; Al-Ani *et al*., 2022). Les champignons saprotrophes opportunistes visent plutôt les stades non mobiles, telles que les œufs (Liu *et al*., 2009). Les champignons nématophages sont spécialisés pour s'alimenter des nématodes, en les attirant et en formant une cheville de pénétration qui permet aux hyphes de se développer et de coloniser le pseudocoélome (**Figure 9**), entraînant ainsi la rupture des organes et des tissus de nématode (Soares *et al*., 2018).

A cet égard les champignons filamenteux offrent une alternative biologique aux méthodes de lutte conventionnelles et constituent une méthode prometteuse pour lutter contre les NPP des agrumes. Les principaux groupes étudiés et utilisés comme agents de biocontrôle sont : *Trichoderma* spp., *Purpureocillium lilacinum, Pochonia chlamydosporia*, *Arthrobotrys oligospora, Drechslerella dactyloides, Dactylaria brochopaga, Dactylellina ellipsospora*, *Catenaria anguillulae*, *Monacrosporium* spp. et *Myzocytzum* (Kumar and Arthurs, 2021). Ces champignons peuvent réduire les dégâts causés par les nématodes, 1) directement par parasitisme, antibiose, paralysie et par la production d'enzymes lytiques (**Figure 9**), et 2) indirectement, soit à travers la compétition pour l'espace et les nutriments, soit en favorisant l'absorption de nutriments et d'eau, en modifiant la morphologie des racines, et en régulant les interactions au niveau de la rhizosphère. Ils sont également capables d'activer les mécanismes de défense de la plante en produisant des hormones comme l'acide salicylique et jasmonique, ainsi que des strigolactones. De plus, les champignons filamenteux peuvent modifier la synthèse

et le transport à travers la plante d'enzymes, de métabolites secondaires, et des composés chimiques de défense ce qui contribue à renforcer la protection de la plante (Poveda *et al*., 2020).

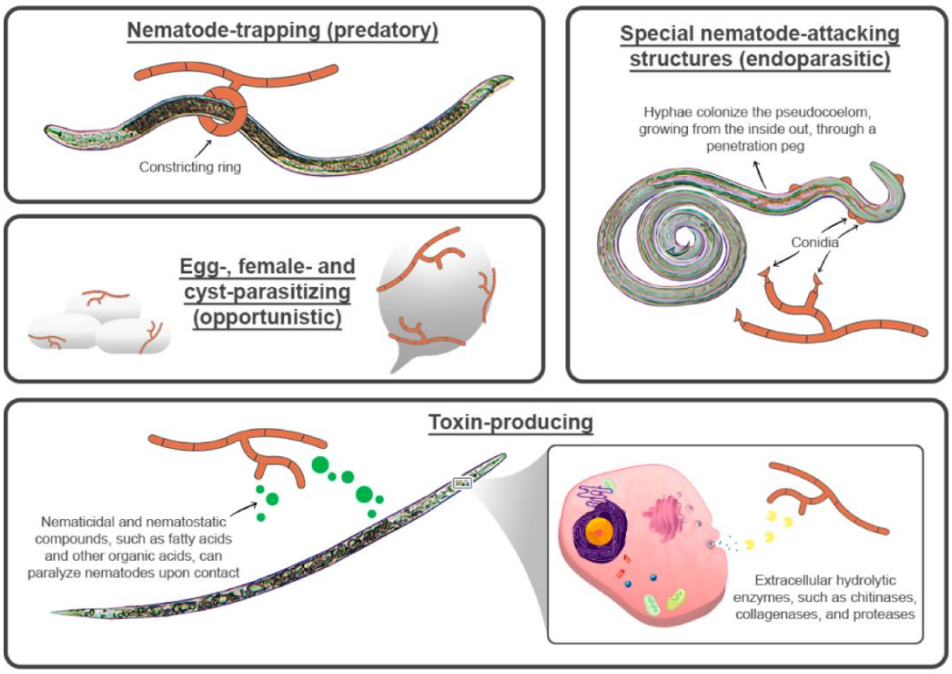


Figure 9. Modes d'action des champignons nématophages (Sasanelli *et al*. 2021).

ii. Champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)

Il existe d'autres microorganismes qui peuvent produire et libérer des composés nématicides ou nématostatiques dans le sol (Li *et al*., 2015). Les mycotoxines sont fréquemment utilisées par les champignons producteurs de toxines pour immobiliser ou tuer les nématodes (Degenkolb and Vilcinskas, 2016). Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA), peuvent améliorer la nutrition hydrique et minérale des plantes hôtes, et réduire leur sensibilité aux NPP en agissant comme des antagonistes intra-racinaires des nématodes (Schouteden *et al*., 2015). Les mécanismes déployés par les CMA pour le biocontrôle de ces parasites peuvent être résumés en deux catégories principales : des effets directs et des effets indirects (**Figure10**). Les effets directs comprennent la compétition pour l'espace et les nutriments entre les CMA et l'agent pathogène, tandis que les effets indirects sont médiés par les plantes et incluent l'induction de la défense des plantes et les modifications des interactions rhizosphériques (changements des exsudats racinaires). Ces mécanismes ne sont pas complètement indépendants et le biocontrôle résulte probablement d'une combinaison des deux (Schouteden *et al*., 2015; Weng *et al*., 2022).

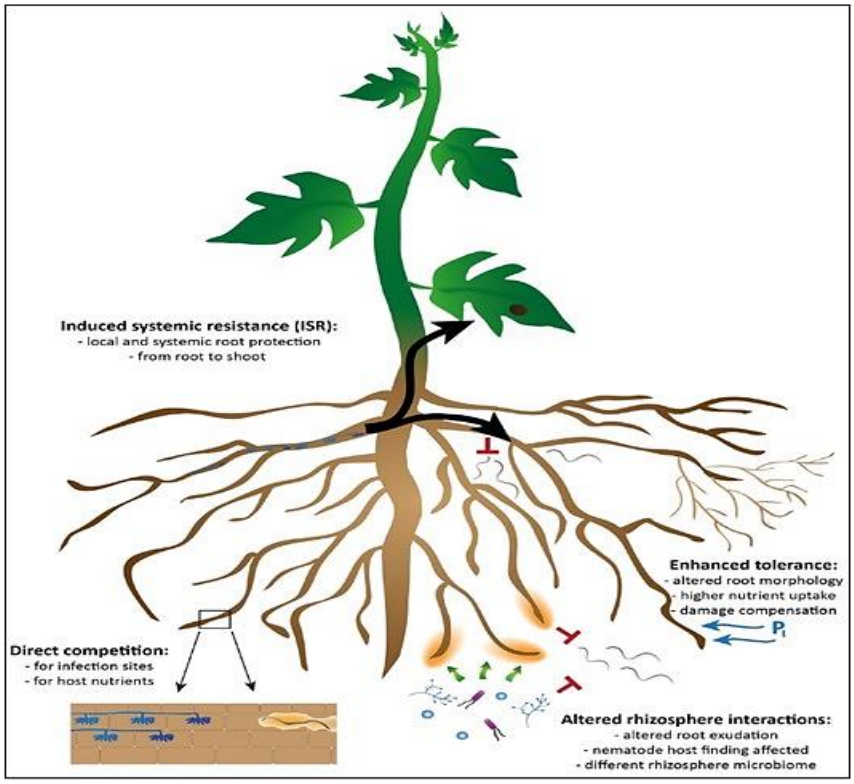


Figure 10. Mécanismes possibles par lesquels les champignons arbusculaires mycorhiziens peuvent contrôler les nématodes phytoparasites (Schouteden *et al*. 2015).

iii. Bactéries

Plusieurs bactéries, y compris des espèces de *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Streptomyces*, *Pasteuria* et *Serratia marcescens*, ont été testées contre les nématodes phytoparasites des agrumes (Kumar and Arthurs, 2021). Ces bactéries utilisent divers mécanismes pour lutter contre ces parasites, notamment la production d'endospores, d'enzymes hydrolytiques, de protéines Cry (toxines formant des pores) et de composés organiques volatils (VOC), qui sont très utiles pour attirer les nématodes. Une fois que ces derniers entrent dans les racines, les bactéries sécrètent des protéases ou des toxines qui les tuent finalement *(*Khan *et al*., 2022; Topalović *et al*., 2020; Wei *et al*., 2003) (**Figure 11**). La colonisation de la rhizosphère par de telles bactéries peut également induire une résistance systémique et améliorer la santé des plantes (Tian *et al*., 2007). Certaines de ces bactéries sont susceptibles d'être des bionématicides, car ils peuvent être aisément cultivés et appliqués par trempage ou lors du traitement des graines (Siddiqui and Shaukat, 2003).

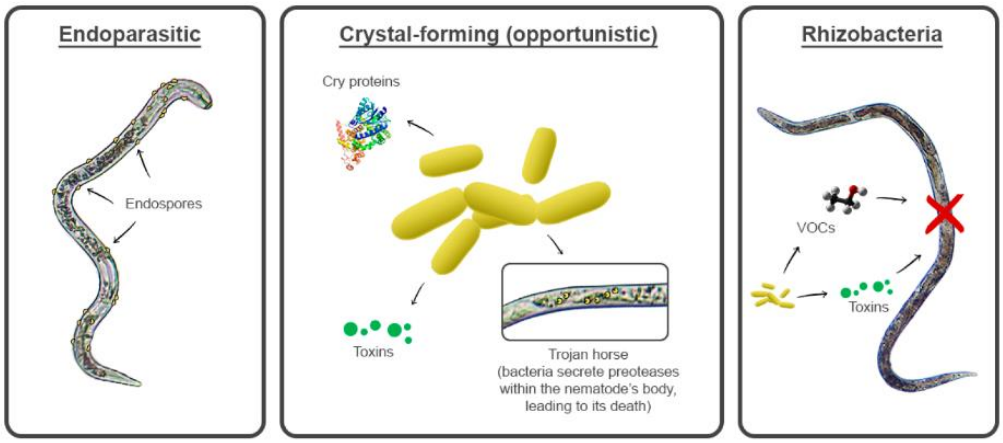


Figure 11. Mode d'action des bactéries contre les nématodes phytoparasites (Sasanelli *et al*. 2021).

Tableau 2. Bionématicides homologués contre les nématodes des agrumes dans différents pays (Kumar and Arthurs 2021).

	Microorganismes	Souche	Produit	Type	Pays	Concentration (Spores/UFC)
Champignons	*Purpureocillium lilacinum (=Paecilomyces lilacinus)*	NA	Paci-N-Power	PM/ LF	Inde (KN BioSciences Pvt. Ltd.)	10^8 /ml
		NA	Bio-Nematon	PM/ LF	Inde (T. Stanes and Company Ltd.)	10^9 /ml
		NA	Nematofree	PM	Inde (International Panacea Ltd.)	2×10^8 /g
		251	BioAct ® Prime	CD	Spain (Bayer)	10^{10}/g
		251	Melocon®	GM	USA (Certis USA)	-
		251	Pl Plus	PM	Afrique du Sud (Biological Control Products)	-
		IIHR-PL2	Paecilo®	P/SP	Inde (Agri Life)	2×10^6 /g
	Pochonia chlamydosporia	NA	NematoFree+	PM	Inde (International Panacea Ltd.)	2×10^6 /g
	Trichoderma harzianum	RSTH 2222	Ecosom®-TH	P/SP	Inde (Agri Life)	2×10^6 /g
	Trichoderma viride	RSTV1111	Ecosom®-TV	P/SP	Inde (Agri Life)	2×10^6 /g
Bactéries	*Bacillus firmus*	MCC0086	BioNemagon™	P/SP	Inde (Agri Life)	10^8 UFC/g
	Bacillus megaterium		BioArc™		Inde (Sphere Bio-Arc Pvt Ltd)	-

Burkholderia rinojensis	A396 (heat killed)	Majestine	Liquide	USA (Marrone Bio Innovations)	1500 BAWKU/mg
Serratia marcescen	MCC0090	BioNemoff™	P/SP	Inde (Agri Life)	10^8 UFCg
Pseudomonas fluorescens	RSPF0033	SheathGuard™	P/SP	Inde (Agri Life)	10^8 UFC/g

PM : Poudre mouillable ; **LF** : Liquide-fluide ; **CD** : Concentré dispersible ; **GM** : Granules mouillable ; **P** : Poudre ; **SP** : Poudre soluble.

c. Plantes aromatiques et médicinales (PAM)

Au cours de ces dernières années, plusieurs produits et dérivés végétaux ont été étudiés pour leurs propriétés nématicides (Chagas, 2015; Miralrio and Espinoza Vázquez, 2020) dont certains ont été transformés en formules nématicides industrielles hautement efficaces *(*Nile *et al*., 2018). Les huiles essentielles provenant des familles de *Brassicacées, Astéracées, Fabacées* et *Lamiacées* sont considérées comme les plus efficaces pour combattre les pathogènes et ravageurs des plantes, notamment les NPP, grâce à leurs propriétés nématicides reconnues (Venkatesh *et al*., 2000; Avato *et al*., 2017; Hernández-Carlos and Gamboa-Angulo, 2019). Ainsi, les plantes aromatiques et médicinales (PAM) pourraient offrir une protection biologique contre les ravageurs en produisant des composés présentant des propriétés répulsives et attractives similaires à celles des pesticides. Ces composés peuvent inclure des métabolites tels que des alcaloïdes, des phénols, des diterpènes, des glucosinolates, des acides gras, des isothiocyanates, des tanins, des stéroïdes des thiényles et des polyphénols (Chitwood, 2002). Ces produits phytochimiques peuvent offrir de nombreux avantages pour l'agriculture s'ils sont utilisés de manière responsable et raisonnée. Ils peuvent aider à améliorer la productivité des exploitations agricoles et à réduire leurs coûts en stimulant la croissance des plantes, en renforçant la protection des cultures, et minimisant l'utilisation des intrants chimiques (Hikal *et al*., 2017).

Les huiles essentielles issues de plantes telles que le thym, la cannelle, le clou de girofle et l'ail se sont révélées hautement toxiques pour *T. semipenetrans* (Montasser, El-wahab, *et al*., 2012; Saadoon *et al*., 2022). En outre, certaines plantes telles que *Tagetes erecta* L., *Datura stramonium* L., *Nerium oleander* L., *Ipomea palmata* L., *Santolina chamaecyparissus* L. et *M. canadensis* ont montré la capacité de réduire la population de larves de *T. semipenetrans* lorsqu'elles sont intercalées avec certaines variétés d'agrumes (Kumari and Singh, 2023).

Divers extraits végétaux tels que l'extrait d'ail, l'extrait de Ziziphus et l'extrait de chou sont également connus pour leur efficacité contre *T. semipenetrans*, contribuant ainsi à

augmenter le rendement des orangers en réduisant la population de nématodes dans le sol et les racines (Saadoon *et al*., 2022). Plusieurs études ont également démontré une forte mortalité de *T. semipenetrans* lorsqu'il est exposé à des extraits aqueux de cormes et de rhizomes de *Cyperus esculentus*. De plus, l'*Azadirachta indica* (Neem) a montré une efficacité maximale dans la mortalité des larves de *T. semipenetrans* (Iqbal, Mukhtar, and Ahmad, 2005). D'autres plantes telles que *Datura metal*, *Nerium oleander*, *Calotropis procera*, *Acacia baileyana* et *Eucalyptus* (Wajid *et al*., 2020) ont également présenté des effets similaires. Cependant, l'efficacité des huiles essentielles et des extraits de plantes peut varier en fonction de divers facteurs, y compris la concentration utilisée, le mode d'application et les conditions environnementales spécifiques (Montasser *et al*., 2012).

CHAPITRE II

DIVERSITE DES NEMATODES PHYTOPARASITES ASSOCIES AUX AGRUMES AU NIVEAU DES CINQ PRINCIPALES REGIONS AGRUMICOLES DU MAROC

I. INTRODUCTION

Les agrumes (*Citrus* spp.) sont des arbres fruitiers largement cultivés dans les régions tropicales et subtropicales du monde entier. Le Maroc bénéficie d'un climat méditerranéen propice à la culture des agrumes, de sols fertiles, de programmes de réforme agricole efficaces et d'une position géographique avantageuse, ce qui lui a permis de se hisser parmi les dix plus grands producteurs d'agrumes dans le monde (Harbouze *et al*., 2019). Cependant, le secteur des agrumes est confronté à plusieurs contraintes qui impactent sa production, en particulier, les nématodes phytoparasites (NPP) qui peuvent nuire à la qualité et au rendement des agrumes (Abd-Elgawad, 2020). Plusieurs espèces de NPP comme *Tylenchulus semipenetrans*, *Radopholus similis*, *Pratylenchus coffee*, *Longidorus elongatus*, *Hoplolaimus* mucronatus, *Helicotylenchus multicinctus*, *Belonolaimus longicaudatus*, *Meloidogyne javanica* et *Meloidogyne incognita* ont été identifiées dans la rhizosphère des agrumes et sont responsables de pertes économiques significatives dans de nombreuses régions du monde (Badii *et al*., 2015; Mokrini *et al*., 2018b). D'autres nématodes sont considérés comme des ravageurs moins importants, car ils causent généralement des dommages limités à des zones géographiques spécifiques, tels que *Hemicycliophora arenaria*, *H. nudata*, *Paratrichodorus lobatus*, *P. minor*, *Pratylenchus brachyurus*, *P. vulnus*, *Xiphinema brevicolle* et *X. index* (Duncan, 2005).

Le nématode des agrumes *T. semipenetrans* est un nématode semi-endoparasite sédentaire qui attaque plus de 75 espèces de rutacées, principalement des agrumes (Duncan, 2000; Sorribas *et al*., 2008). Il a été trouvé dans la plupart des régions productrices d'agrumes du monde et dans une grande variété de types de sol (Milne and De Villiers, 1977; Duncan, 2005). Les arbres infestés présentent une réduction de la vigueur, une chlorose foliaire, une chute des feuilles, un dépérissement et une réduction de la qualité et de la quantité des fruits (Cohn, 1969). Ce nématode représente 99,1% de la communauté totale des nématodes en Egypte (Hammam *et al*., 2016), 89% dans le nord de l'Iran, 26% en Floride et en Californie (USA), et 70-90% en Espagne (Shokoohi and Duncan, 2018). Au Maroc, *T. semipenetrans* a été trouvé associé à divers porte-greffes dans de nombreuses régions productrices d'agrumes (Mokrini *et al*., 2018a).

L'infection des racines des agrumes par les nématodes affecte gravement la capacité des racines à absorber l'eau et les nutriments minéraux (Duncan, 2005). De plus, la pénétration des nématodes dans le système racinaires provoque des lésions qui peuvent faciliter leur invasion

par différents autres agents pathogènes, tels que les champignons, les virus et les bactéries, qui sont à l'origine d'un complexe de maladies chez les arbres d'agrumes (Nasiri *et al*., 2014).

Actuellement Il existe peu d'informations sur la distribution et la densité des NPP associées aux agrumes au Maroc. Seules deux études ont été menées à ce sujet, l'une par Vilardebo en 1964 et l'autre par Mokrini *et al*. en 2018. Compte tenu de ce manque de données et d'informations, l'objectifs de cette partie de travail est d'actualiser et de fournir plus d'informations sur les NPP associés aux agrumes au Maroc. Il s'agit d'étudier leur distribution géographique au niveau de principales zones de culture d'agrumes. Cela comprendra (**i**) l'établissement de l'inventaire des NPP associés à la rhizosphère des agrumes, leur identification morphologique et la caractérisation moléculaire de ceux qui ont une importance économique, (**ii**) l'étude de leur distribution (détermination de leur prévalence, intensité d'infestation et densité dans le sol rhizosphérique et les racines) dans les principales régions agrumicoles du Maroc, et (**iii**) l'examen des corrélations entre la distribution des nématodes et les propriétés physico-chimiques du sol des agrumes au niveau des principales régions agrumicoles marocaines.

Les questions scientifiques formulées lors de ce chapitre sont : Les vergers agrumicoles marocains sont-ils infestés par les NPP et à quel degré ? Comment sont distribués les NPP à travers les régions agrumicoles marocaines ? et quels sont les principaux facteurs gouvernant cette distribution ?

II. MATERIEL ET METHODES

1. Sites d'étude

Les prospections ont été effectuées en décembre 2020 et février 2021, dans les principales régions agrumicoles du Maroc (Souss-Massa, Marrakech-Safi, Beni-Mellal-Khenifra, et Gharb et Berkane). Un total de 250 échantillons de sols et de racines ont été collectés des régions étudiées sous différents types de porte-greffes (**Tableau 3**). Les sites échantillonnés sont répartis entre plusieurs régions géographiques (**Figure 12**) : Au niveau de la région de Souss-Massa (3 sites); au niveau de la région de Marrakech-Safi (3 sites); au niveau de la région de Beni-Mellal (2 sites) ; au niveau de la région de Gharb (4 sites) ; et au niveau de la région de Berkane (2 sites).

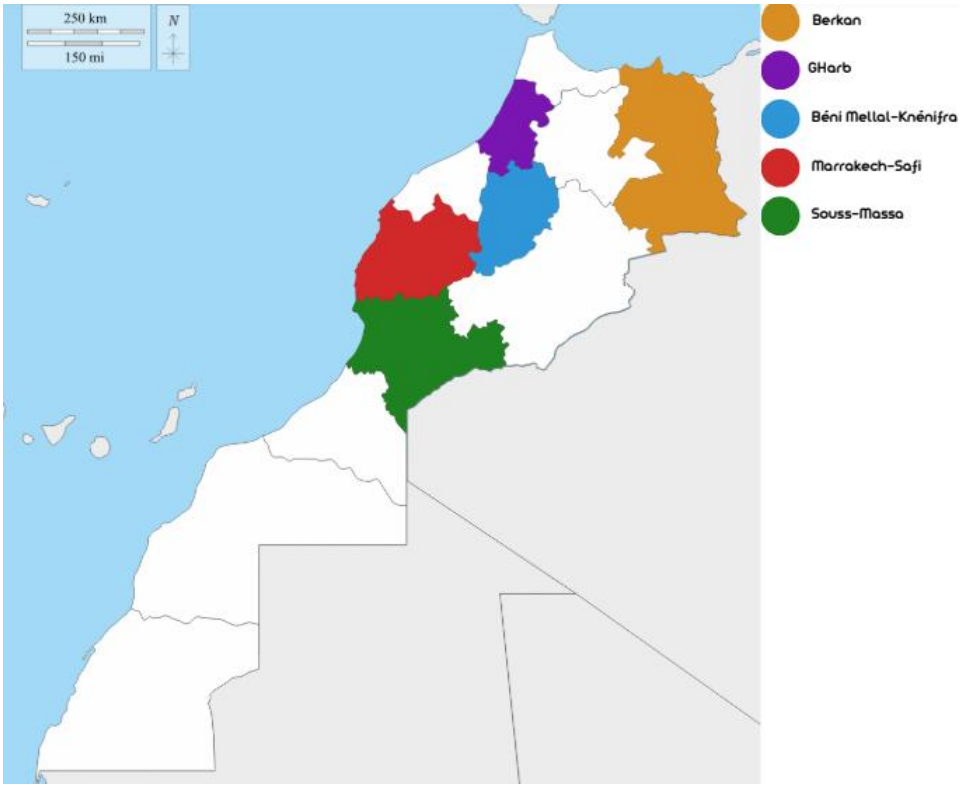


Figure 12. Distribution des régions d'échantillonnage des agrumes.

Tableau 3. Répartition des échantillons analysés par zone de prospection et par porte-greffe d'agrumes.

Région	Echantillons	Porte greffe
Souss -Massa	30	*Citrange carrizo* *Citrus aurantium* *Citrus macrophylla*
Marrakech-Safi	60	*Citrus aurantium* *Citrange Troyer* *Citrange carrizo* *Citrus volkameriana* *Citrange C-35*
Beni Mellal-Khenifra	60	*Citrus aurantium* *Citrange carrizo* *Citrus volkameriana* *Citrange C-35*
Gharb	45	*Citrange troyer* *Citrus aurantium* *Citrange carrizo*
Berkane	55	*Citrus aurantium* *Citrange Carrizo* *Citrus volkameriana*
Total	**250**	

2. Echantillonnage

Au niveau de chaque site prospecté, les arbres ont été choisis pour l'échantillonnage. Cinq échantillons de sols rhizosphériques et de racines ont été prélevés à l'aide d'une tarière, à 50 cm du tronc et à une profondeur située entre 0 et 40 cm. Les échantillons ont été ensuite mélangés et homogénéisés afin d'obtenir un seul échantillon représentatif de chaque arbre. Les prélèvements des échantillons de sol et de racines ont été effectués en Zig Zag en évitant les extrémités des vergers où les interventions humaines sont fréquentes. La densité des arbres varie en fonction de la variété de greffon, celle-ci pouvant être de 6×4 ou 6×2 (**Figure 13**). Chaque arbre a été considéré comme une répétition statistique. L'ensemble des échantillons collectés ont été conservés au laboratoire pour analyse des paramètres nématologiques (effectués au laboratoire de nématologie à l'INRA de Rabat) et des propriétés physico-chimiques des sols.

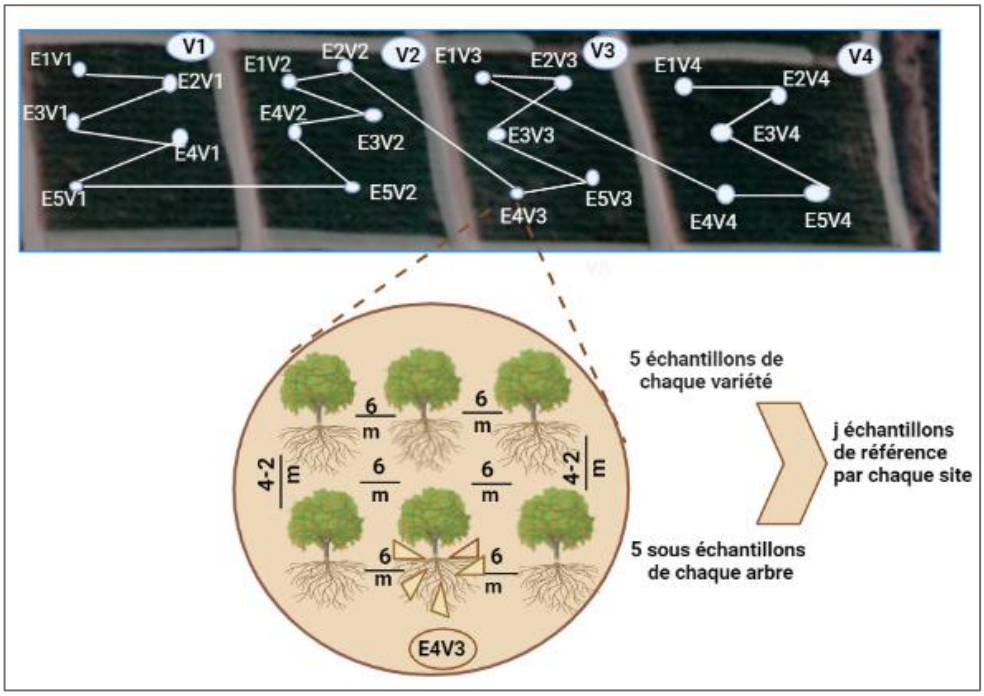


Figure 13. Procédures d'échantillonnage suivies dans les vergers d'agrumes.
Vx : variété porte greffe x.

3. Analyses nématologiques

a. Extraction des nématodes

L'extraction des nématodes a été réalisée selon la méthode de Baermann (1917) modifiée par Flegg and Hooper, (1970), qui consiste à la quantification des nématodes phytoparasites présents dans les échantillons de sol en se basant sur leur capacité à migrer à

travers un filtre (25-30 µm). Pour ce faire 100 g de sol sont placés sur le filtre placé sur cuvette contenant de l'eau. Au cours des 48 heures qui suivent, les nématodes traversent le filtre au fond des cuvettes où ils sont récupérés, dénombrés et observés sous la loupe binoculaire.

Une technique similaire a été utilisée pour l'extraction des nématodes à partir des racines. En effet, 20 g de racines ont été préalablement nettoyés et réduits en fragments de moins de 1 cm de longueur. Ces fragments ont été mélangés avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5% et broyés pendant 30 secondes. Le mélange résultant a été placé sur un filtre et laissé reposer pendant 48 heures, permettant ainsi aux nématodes de migrer hors des fragments de racines.

Les nématodes ont été ensuite identifiés au rang de l'espèce, au laboratoire de nématologie à l'INRA de Rabat, sous un stéréomicroscope en utilisant des caractéristiques morphobiométriques fiables et en se référant à des clés d'identifications (Taylor and Netscher 1974; Mai and Mullin 1996).

Les suspensions de nématodes obtenues ont été fixés dans du formaldéhyde 4% chaud conformément à la méthode De Grisse (1969). Ensuite, les nématodes ont été transférés dans un verre de montre carré de 7 cm rempli d'une solution à 99% de formaldéhyde et 1% de glycérol pur (solution I). Le verre de montre a été placé dans un dessiccateur contenant plus de 2/3 de son volume d'éthanol à 96% et incubé à 40 ◦C pendant 12 heures. Le verre de montre a été par la suite transféré dans un incubateur à 37 ◦C et traité avec 3 ml d'une solution composée de 95% d'éthanol et de 5% de glycérol pur (solution II), partiellement recouvert d'une lame de verre pour ralentir l'évaporation. Enfin, 2 ml d'une solution contenant 50% d'éthanol et 50% de glycérol pur (solution III) ont été ajoutés, et le verre de montre a été laissé dans l'incubateur pendant une nuit à 37 ◦C. Les nématodes ont été montés sur des lames de verre et examinés sous un microscope optique (Grossissement ×1000) pour leur identification, selon la méthode décrite par Taylor and Netscher (1974). La prévalence, l'intensité d'infestation et la densité des nématodes ont été déterminées selon les formules suivantes :

$$\boldsymbol{Prévalence} = \frac{\boldsymbol{E}}{\boldsymbol{N}} \times \mathbf{100}$$

Où

E = nombre d'échantillon où le nématode est présent,
N = nombre total d'échantillons prélevés.

$$\boldsymbol{Intensité} = \frac{\boldsymbol{\Sigma Xi}}{\boldsymbol{E}}$$

Où

Xi = nombre de nématodes du genre/espèce considéré par 100 g de sol ou 20 g de racines,
E= nombre d'échantillons où le nématode est présent.

$$\textbf{Densité} = \text{Nombre maximal d'un genre/espèce de nématode particulière}$$

Densité totale = Nombre total des NPP trouvés dans les différents échantillons de sol ou de racines observés par région.

b. Diversité taxonomique des NPP

La diversité des nématodes phytoparasites en communautés a été décrite avec plusieurs indices de diversité :

i. Nombre total de nématodes

Le nombre total de NPP (N) : il s'agit du nombre total d'individus dans une communauté.

ii. Indice de biodiversité Shannon-Winner

L'indice de biodiversité Shannon-Winner (diversité locale) est une mesure de la diversité biologique d'un écosystème ou d'une communauté écologique (Di Bitetti, 2000). Cet indice est calculé en prenant en compte à la fois la richesse (nombre total de différentes espèces) et l'équité (ou égalité) de la répartition des individus entre ces espèces. Plus précisément, il permet de quantifier l'hétérogénéité de la diversité. Il est calculé selon la formule suivante (Krebs 1985) :

$$\boldsymbol{H' = -\sum_{i-1}^{s} pi\ Ln\ (pi)}$$

Où

H' : Indice de biodiversité Shannon-Winner,

Pi : Nombre d'individus de l'espèce i divisé par le nombre total d'individus (ni/N),

S : le nombre total de genres et d'espèces formant le peuplement,

Ln (pi) : le logarithme népérien de pi.

Plus la valeur de l'indice de biodiversité Shannon-Winner est élevée, plus la diversité biologique de la communauté écologique est considérée comme importante (Omayio *et al*., 2019). H' varie de 0 à ln(S).

iii. Indice de biodiversité Evenness

L'indice de biodiversité Evenness, également connu sous le nom de l'indice de régularité ou d'équitabilité de Pielou, mesure la diversité spécifique relative à l'équité de

la distribution des individus entre les espèces. Il permet d'obtenir une mesure de l'équité de la répartition des individus parmi les différentes espèces dans l'échantillon. (Marcon, 2018). L'indice de Pielou varie de 0 (échantillon où toutes les espèces ont la même abondance/répartition inégale) à 1 (échantillon avec une répartition parfaitement équitable des individus entre les différentes espèces/ répartition équitable). L'indice de biodiversité Evenness est souvent utilisé en combinaison avec l'indice de Shannon-Wiener pour évaluer la diversité et la régularité des communautés biologiques. Cet indice est calculé par la formule suivante (Pielou, 1969) : $\boldsymbol{E = \frac{H'}{Ln(s)}}$

Où

H': Indice de biodiversité Shannon-Winner,

S : le nombre total de genre et d'espèces formant le peuplement.

4. Caractérisations moléculaires des NPP

a. Extraction de L'ADN, amplification PCR et séquençage

L'extraction de l'ADN, la PCR et le séquençage pour l'identification moléculaire des nématodes ont été effectuées au sein de l'école nationale d'agriculture de Meknès (ENA). Seuls les nématodes ayant un intérêt économique ont été pris en considération pour la caractérisation moléculaire. En effet, l'ADN a été extraite à partir d'un seul nématode, en suivant le protocole décrit par Holterman *et al*. (2006). La région D2-D3 a été amplifiée avec les amorces directes D2a (5′-ACA AGTACC GTG AGG GAA AGT TG-3′) et les amorces inverses D3b (5′-TCG GAA GGA ACCAGC TAC TA-3′) selon la méthode de De Ley *et al*., (1999). Pour chaque réaction PCR, 1 µl d'ADN a été ajouté au mélange de réaction PCR contenant 22 µl ddH2O, 25 µl 2 × DreamTaq PCR Master Mix (Fermentas Life Sciences, Leon-Rot, Allemagne), et 1 µM des deux amorces. Le programme du thermocycleur consistait en 5 min à 95 °C ; 35 cycles de 1 min à 94 °C, 45 s à 49 °C, et 1 min à 72 °C, suivis d'une étape d'élongation finale de 8 min à 72 °C. Après la PCR, 5 µl de chaque produit PCR ont été mélangés avec 1 µl de tampon de charge 6× (Fermentas Life Sciences, Allemagne) et chargés sur un gel d'agarose standard tamponné à 1,5%. Après électrophorèse (100 V pendant 40 min), le gel a été coloré avec du bromure d'éthidium (0,1 µg ml^{-1}) pendant 20 min, visualisé et photographié sous lumière UV. Le reste du produit PCR a été conservé à -20 °C. Les produits PCR purifiés ont ensuite été séquencés dans les deux sens, Les séquences obtenues ont été récupérées sous forme de chromatogrammes, puis corrigées, alignées et analysées avec les logiciels Chromas 2.00 et

BioEdit 7.0.4. Les séquences alignées ont été « blastées » sur GenBank afin de déterminer l'espèce. Ensuite, les données ont été analysées à nouveau avec l'alignements des séquences en utilisant le programme MEGA 11 version 11.0.13 pour l'élaboration de l'arbre phylogénétiques.

5. Analyses physico-chimiques du sol

a. PH eau

Après tamisage de sol (2 mm), dix grammes de chaque échantillon ont été mélangés avec 25 ml d'eau distillée, le mélange a été agité pendant 30 min à l'aide d'un agitateur mécanique puis laissé au repos pendant 2 heures. Après décantation et filtration sur un filtre quantitatif type N° 42 Whatman. Le pHeau de chaque sol a été mesuré par un pH-mètre étalonné.

b. Conductivité électrique (CE)

La conductivité électrique permet d'évaluer la teneur globale en sels dissous dans le sol. Elle consiste à préparer une suspension de 20 g de sol dans 100 ml d'eau distillée, le mélange est agité pendant 1 heure puis laissé reposer à température ambiante. La conductivité électrique a été mesurée à l'aide d'un conductimètre étalonné par une solution de KCl (0,01N).

c. Humidité du sol

L'humidité du sol dépend de la qualité du sol et de sa capacité à retenir l'eau. Elle a été déterminée la pesée (MH) puis le séchage (MS) de 100 grammes de sol à l'étuve pendant 24 heures à 105°C. Le taux d'humidité est ensuite calculé par la formule suivante :

$$\boldsymbol{H}(\%) = \frac{(\mathbf{MH} - \mathbf{MS})}{\mathbf{MH}} \times \mathbf{100}$$

H : Taux d'humidité,
MH : Masse de sol humide,
MS : Masse de sol sec.

d. Calcaire total

Le taux de calcaire total est défini comme étant la totalité du calcaire dosé par destruction à l'HCl. Il a été réalisé en utilisant la méthode du calcimètre de BERNARD qui repose sur la décomposition du carbonate de calcium par l'acide chlorhydrique et la mesure du volume de CO2 obtenu. La mesure a été réalisée en utilisant un calcimètre étalonné par l'action

d'HCl dilué à ½ sur le calcaire pur (Michel-Dewez and Ek, 1982). La teneur en CaCO3 est calculée selon la formule suivante :

$$\mathbf{CaCO3}(\%) = \frac{\textbf{Masse de témoin x volume de CO2 dans l'échantillon}}{\textbf{Masse de sol x volume de CO2 dégagé dans la réaction de témoin}}$$

e. Carbone organique total

Le dosage du carbone a été réalisé selon la méthode d'Anne décrit par Aubert (1978) qui est basée sur l'oxydation du carbone de la matière organique par un mélange de bichromate de potassium et d'acide sulfurique à 135 ºC. L'excès de bichromate de potassium (K2Cr2O7) formé, qui est proportionnel à la quantité de carbone présente dans le sol, est ensuite titré avec le sel de Mohr. Pour ce faire, 1g de sol bien broyé et tamisé a été ajouté de 10 ml de bichromate de potassium 8% et 15 ml d'acide sulfurique concentré qu'on a mis en agitation pendant une minute. Après décantation, la suspension a été titrée par l'ajout de 10 ml d'acide phosphorique et 2 gouttes de diphénylamine. Le dosage a été fait par le sel de Mohr N/2 jusqu'au virage du bleue-violet au vert clair. Le carbone organique total est calculé selon la formule suivante :

$$\boldsymbol{C.O.T} = \frac{(\mathbf{VT} - \mathbf{VE})}{\mathbf{M} \times \mathbf{VT}} \times \mathbf{3,9}$$

COT% : carbone organique total,
VT : Volume de titrage du témoin en ml,
VE : Volume de titrage de l'échantillon en ml,
M : Masse de la prise d'essai en g,
3,9 : Nombre de mg de C par ml de bichromate.

La teneur en matière organique et calculé ensuite selon la formule suivante :

$$\boldsymbol{MO}(\%) = \mathbf{COT\% \ x \ 1,72}$$

1,72 = le coefficient de Waksman

f. Phosphore assimilable

Le dosage du phosphore assimilable a été effectué selon la méthode d'Olsen *et al*. (1983) qui consiste à extraire les orthophosphates par une solution de bicarbonate de sodium. Ce dosage est basé sur les propriétés des molybdates qui, en milieu acide et en présence du phosphore, donnent naissance à un complexe phosphomolybdique qui s'accompagne d'une coloration bleu ciel dont l'intensité est proportionnelle à la quantité du phosphore présent dans le milieu considéré. Ainsi, 1 g de sol a été additionné de 20 ml de bicarbonate de sodium 0,5 M

(NaHCO3), agité pendant 1 heure puis filtré. Un volume de 1 ml du filtrat a été additionné de 4 ml d'eau distillée et 5 ml du réactif AB (**Annexe I**), porté à ébullition pendant 10 min, et laissé refroidir. Une lecture au spectrophotomètre 820 nm a été effectuée.

g. Azote total

La mesure de l'azote total a été réalisée selon la méthode de Kjeldahl modifiée par Barbano *et al*. (1990) résumée en trois étapes. Tout d'abord, l'étape de minéralisation qui s'est étalée pendant 30 min à 125° pour le premier cycle, et 2h à 400°C pour le deuxième cycle. Pour cela 10 ml d'acide sulfurique concentré ont été mélangés avec 1g d'échantillon dans un tube en présence du catalyseur Kjeldahl. Ensuite le mélange a subi une étape de distillation où on a ajouté la soude (40%) qui déplace l'ammoniac formé. Enfin l'étape de titrage où l'ammoniac entrainé par la vapeur d'eau et fixé par l'acide borique et titré avec l'acide sulfurique. Ce qui permet de calculer la teneur en ammonium de l'échantillon.

$$\boldsymbol{N}(\%) = (\mathbf{VE} - \mathbf{VB})\ \mathbf{x}\ [\mathbf{H2SO4}]\mathbf{x10} - \mathbf{3}\ \mathbf{x}\ \mathbf{M}(\mathbf{N})\ \mathbf{x}\ \mathbf{masse\ d'échantillon}\ \mathbf{x}\ \mathbf{100}$$

VE = Volume de l'échantillon,
VB = Volume du blanc M,
(N)= Masse molaire d'azote.

h. Dosage de Na+, K+, Ca2+ et du phosphore total

L'évaluation de la teneur en éléments minéraux a été réalisée par calcination, ainsi 2 g du sol ont été mis dans un four à 600°C pendant 6 heures en présence de 2 ml d'acide sulfurique. Après l'étape de minéralisation, 3 ml d'HCl ont été ajoutés au substrat et le mélange a été chauffé jusqu'ébullition. Ensuite, 100 ml d'eau distillée ont été ajoutés au substrat, après la suspension a été bien agitée pendant 60 minutes puis filtrée. Pour le dosage du phosphore total, 1 ml de filtrat a été prélevé dans un tube auquel ont été ajoutés 4 ml d'eau distillée et 5 ml du réactif AB (**Annexe I**), enfin on a effectué une lecture spectrophotométrique à une longueur d'onde de 720 nm. D'autre part les teneurs en K+, Na+, Ca2+ ont été déterminées suivant la méthode de (Brown and Lilleland, 1946) à l'aide d'un spectrophotomètre à flamme, à partir du même filtrat utilisé pour le dosage de phosphore total.

6. Analyses statistiques

Les données quantitatives ont été exprimées en tant que moyennes d'expériences triples ± écart-type standard. La signification de la différence entre les moyennes a été testée par analyse de la variance. Les tests à plages multiples de Tukey à $p < 0.05$ ont été réalisés à l'aide

du logiciel SPSS (Version 25). Les tests de corrélations ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0.2.

III. RESULTATS

1. Diversité taxonomique morphologique des NPP

La liste des NPP identifiés morphologiquement dans tous les vergers d'agrumes étudiés est présentée dans les **Tableau 4-6**. Onze genres et dix espèces de NPP ont ainsi été identifiés dans les différents échantillons de sol et de racines examinés. Globalement, les résultats montrent que certaines espèces de nématodes comme *T. semipenetrans* et certains genres comme *Helicotylenchus* sont omniprésents dans tous les sites et régions d'agrumes examinés. Cependant, d'autres espèces semblent être spécifiques à une certaine région donnée voire même à un site donné comme les nématodes de lésions racinaires *Pratylenchus thornei* et *P. neglectus* qui n'ont été observées que dans la région de Berkane et le genre *Hemicycliophora* qui n'a été détécté que dans le site de Souihla (région de Marrakech-Safi). En revanche, les espèces *Xiphinema diversicaudatum, X. americanum* et *X. pachtaichum* n'ont été détectées dans aucun site des régions du Gharb et de Marrakech-Safi.

2. Paramètres nématologiques

L'utilisation des paramètres nématologiques quantitatifs tels que la densité totale (**Figure 14**), la prévalence (**Tableau 4**), l'intensité d'infestation (**Tableau 5**) et la densité maximale (**Tableau 6**) est cruciale pour mieux comprendre la distribution de ces genres et espèces de nématodes dans les différentes régions étudiées.

a. Densité totale

La densité totale correspondant au nombre total de NPP noté par région a été plus élevée dans la région de Beni Mellal Khenifra, avec 2451 nématodes/100 g de sol et 20 g de racines (**Figure 14**), suivie par la région de Marrakech-Safi (2064 nématodes/100g de sol et 20g de racines) et de Berkane (1935 nématodes/100g de sol et 20g de racines). Tandis que la région de Souss Massa a montré la densité totale la plus faible, avec seulement 207 nématodes/100 g de sol et 20 g de racines.

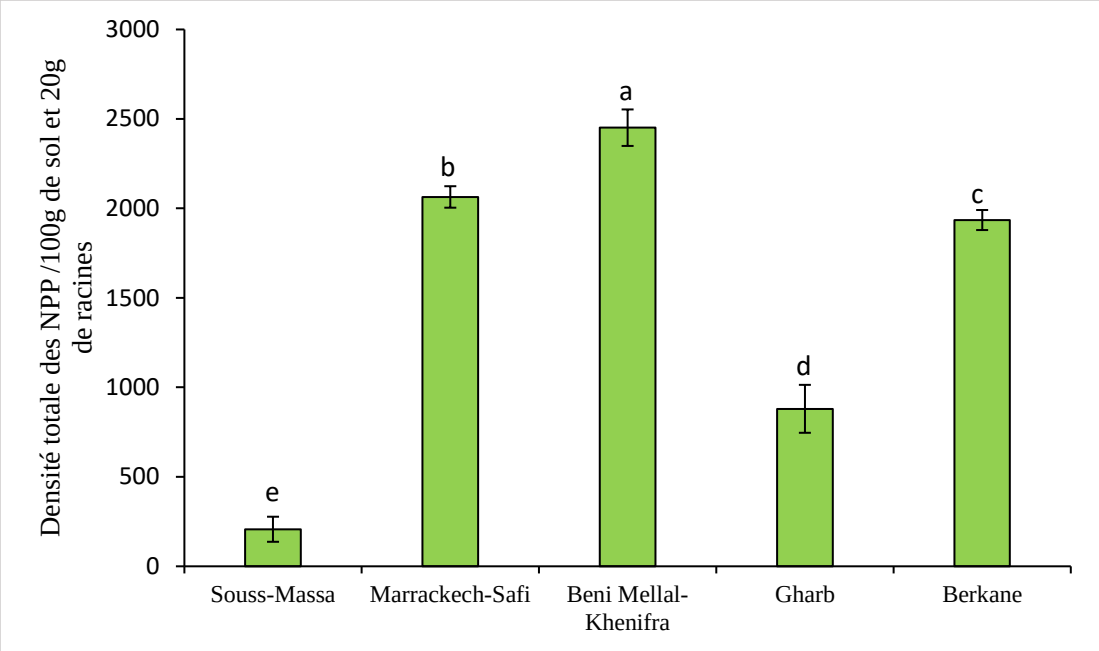


Figure 14. Densité totale de NPP dans les sols rhizosphériques (100 g) et les racines (20 g) de différentes régions agrumicoles Marocaines étudiées.

b. Prévalence

L'espèce *T. semipenetrans* s'est avérée être la plus fréquente dans tous les sites des différentes régions étudiées. A l'exception des sites de Balfa (région de Sous-Massa), de Souk Sebt (Région de BéniMellal), Sidi Slimane (région de Gharb) et Zegzel (région de Berkane) qui ont enregistré une prévalence de *T. semipenetrans* de 50%, tous les autres sites ont présenté des prévalences supérieures à 66,7%. Ce nématode a même atteint une prévalence de 100% dans les sites de Taroudant (région de Souss) et M'nasra (région de Gharb) (**Tableau 4**). Le genre *Pratylenchus s'*est classé au deuxième rang à Souihla (66,7 %), Es saada (61,1%) et Agafai (53,3%) dans la région de Marrakech, ainsi qu'à Souk sabt (46,7%) et Guettaya (33,3%) dans la région Beni-Mellal, et à Sidi Kacem (42,9%) et à M'nasra (40%) dans la région de Gharb (**Tableau 4**). Le genre *Helicotylenchus* a également occupé le deuxième rang à Belfa (62,5%) et à Taroudant (50%) dans la région de Sous-Massa, ainsi qu'à, Sidi Slimane (50%) et M'nasra (40%) dans la région de Gharb et à Agafai **(**53,3%) dans la région de Marrakech.

c. Intensité d'infestation

L'espèce *T. semipenetrans* a enregistré l'intensité d'infestation la plus élevée, aussi bien au niveau du sol rhizosphérique (75 nématodes/100g de sol) qu'au niveau des racines (27 nématodes/20g de racines), à Guettaya (Beni-Mellal), alors que la plus faible infestation par ce nématode (2 nématodes/100g de sol et 2 nématodes/20g de racines) a été notée à Biogra (Souss)

(**Tableau 5**). Le genre *Helicotylenchus* a affiché l'intensité d'infestation la plus élevée (13 nématodes/100g de sol et 1 nématodes /20g de racines) à M'nasra (Gharb). À l'inverse, la plus faible intensité d'infestation a été observée à Biogra (Souss) et Sidi Slimane (Gharb) avec seulement 2 nématodes/100g de sol et 0 nématode/20g de racines (**Tableau 5**). En revanche, pour le genre *Pratylenchus*, l'intensité d'infestation la plus élevée a été observée à Guettaya (Gharb) avec 10 nématodes/100g de sol et 8 nématodes/ 20g de racines, tandis que Taroudant (Souss) a été la moins infesté, avec un seul nématode/100g de sol et 0 nématode par 20g de racines (**Tableau 5**).

d. Densité maximale

La valeur la plus élevée de densité maximale, correspondant au nombre le plus élevé d'individus d'une espèce ou d'un genre particulier observé parmi l'ensemble des échantillons analysés a été attribuée à l'espèce *T. semipenetrans*. Cette espèce a enregistré la valeur la plus élevée aussi bien au niveau du sol rhizosphérique (213 nématodes/100g de sol) que dans les racines (59 nématodes/20g de racines) à Guettaya (Beni-Mellal), alors que les valeurs les plus faibles (4 nématodes/100g de sol et 2 nématodes/20g de racines) ont été notées à Biogra (Souss) (**Tableau 6**). Le site de Guettaya (Beni-Mellal) a enregistré également les densités maximales des genres *Helicotylenchus* (14 nématodes/100g de sol et 7 nématodes/20g de racines) et *Pratylenchus* (avec 27nématodes par 100g /sol et 16 nématodes/ 20g de racines). En revanche, les plus faibles densités maximales des ces deux genres ont été enregistrées respectivemement à Belfa (3 nématodes par 100g/ sol et 1 nématodes/ 20g de racines) et à Taroudant (1 nématodes/100g de sol et 0 nématodes par 20g de racines) (**Tableau 6**).

D'autres genres de nématodes, tels que *Tylenchorhynchus, Paratylenchus, Trichodorus, Longidorus* et *Rotylenchus*, ont également été repérés dans toutes les régions étudiées. Cependant, leurs prévalences, leurs intensités d'infestation et leurs densités totale se sont révèlées nettement inférieures par rapport aux genres précédemment mentionnés.

Tableau 4. Prévalence (%) des NPP des sols rhizosphériques (100 g) et de racines (20 g) des différentes régions agrumicoles étudiées.

	Souss-Massa			Marrackech-Safi			Beni Mellal-Khenifra			Gharb			Berkane	
	Balfa	**Biogra**	**Taroudant**	**Souihla**	**Es Saada**	**Agafai**	**Souk Sebt**	**Guettaya**	**M'nasra**	**Allal Tazi**	**Sidi Slimane**	**Sidi Kacem**	**Zegzel**	**Aglmine**
Tylenchulus semipenetrans (TS)	50	80	100	86,7	83,3	73,3	50	66,7	100	66,7	50	85,7	50	81,8
Pratylenchus spp. (Pra)	31,3	70	16,7	66,7	61,1	53,3	46,7	33,3	40	-	-	42,9	37,5	54,5
Pratylenchus vulnus (Pv)	-	-	-	13,3	11,1	20	10	10	20	-	-	-	6,3	22,7
Pratylenchus coffeae (Pc)	-	-	-	26,7	27,8	-	1,0	20,0	13,3	40	-	-	12,5	27,3
Pratylenchus thornei (Pt)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,5
Pratylenchus neglectus (Pn)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1	18,2
Paratylenchus spp. (Par)	25	-	16,7	-	44,4	12,5	13,3	13,3	-	-	-	6,3	6,3	-
Helicotylenchus spp. (Hel)	62,5	30	50,0	15,2	33,3	53,3	26,7	26,7	40	5	50	14,3	34,4	50
Tylenchus spp. (Tyl)	37,5	-	-	20	27,8	33,3	20	30	20	-	50	-	25	27,3
Xiphinema spp. (Xip)	12,5	30	-	46,7	16,7	26,7	16,7	23,3	20	15,4	-	28,6	18,8	9,1
Xiphinema diversicaudatum (Xd)	-	-	-	13,3	10,0	-	16,7	13,3	-	-	-	-	3,1	13,6
Xiphinema. americanum (Xa)	-	-	-	13,3	22,2	20	10	6,7	-	-	-	-	3,1	-
Xiphinema pachtaichum (Xp)	-	-	-	-	-	-	-	6,7	-	-	-	-	6,3	-
*Hoplolaimus indicus (*Hi)	-	-	-	6,7	5,6	8,3	6,7	13,3	-	20	50	-	9,4	9,1
Scutellonema bradys (Sb)	-	-	-	-	-	-	-	3,3	-	-	20	-	-	2,0
Rotylenchus spp. (Rot)	6,3	20	40	13,3	16,7	6,7	16,7	10	-	-	-	14,3	15,6	4,5
Tylenchorhynchus spp. (Tyle*)*	12,5	10	-	13,3	22,2	13,3	20	16,7	20	50	25	-	18,8	13,6
Meloidogyne spp. (Mel*)*	-	-	33,3	33,3	38,9	33,3	26,7	16,7	20	20	-	31,3	15,6	4,5
Trichodorus spp. (Tri)	-	-	-	13,3	-	20	10	3,3	-	7,7	-	18,8	3,1	4,5
Criconemoides spp.(Cri)	-	-	-	20	-	12,5	-	-	-	-	-	-	3,1	-
Hemicycliophora spp. (Hem)	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Longidorus spp. (Lon)	-	-	-	13,3	22,2	20	13,3	20,0	6,7	20	-	-	3,1	13,6

- : Absence de NPP

Tableau 5. Intensité des NPP des sols rhizosphériques (100 g) et de racines (20 g) des différentes régions agrumicoles étudiées.

	Souss-Massa						Marrackech-Safi						Beni Mellal-Khenifra						Gharb						Berkane			
	Balfa		Biogra		Taroudant		Souihla		Es Saada		Agafai		Souk Sebt		Guettaya		M'nasra		Allal Tazi		Sidi Slimane		Sidi Kacem		Zegzel		Aglmine	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	Sol	R	S	R	S	R	S	R	S	R
Tylenchulus semipenetrans (TS)	3	2	2	2	7	3	44	12	38	11	14	6	36	23	75	27	5	1	22	3	4	5	17	2	47	12	64	18
Pratylenchus spp. (Pra)	1	1	5	2	1	-	4	4	4	3	4	2	5	4	10	8	3	2	-	-	-	-	3	2	4	6	3	5
Pratylenchus vulnus (Pv)	-	-	-	-	-	-	3	2	1	2	3	3	3	4	5	2	5	-	-	-	-	-	-	3	4	-	2	3
Pratylenchus coffeae (Pc)	-	-	-	-	-	-	3	3	3	4	-	1	5	3	4	4	3	1	2	-	-	-	-	-	3	4	3	5
Pratylenchus thornei (Pt)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-
Pratylenchus neglectus (Pn)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	4	-
Paratylenchus spp. (Par)	2	2	2	-	2	-	-	4	4	2	3	2	3	3	3	2	-	1	-	-	-	-	3	2	3	2	-	3
Helicotylenchus spp. (Hel)	2	1	2	-	4	2	4	3	5	4	5	3	8	7	6	4	13	1	2	1	2	-	1	-	6	3	5	7
Tylenchus spp. (Tyl)	5	3	-	-	-	-	8	-	9	-	6	-	10	3	8	5	4	-	-	-	6	2	-	-	11	4	6	6
Xiphinema spp. (Xip)	1	-	2	-	-	-	3	-	3	-	5	-	3	-	5	5	4	-	2	1	-	3	3	-	5	-	4	-
Xiphinema diversicaudatum (Xd)	-	-	-	-	-	-	2	-	4	-	-	-	3	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3	-
Xiphinema. americanum (Xa)	-	-	-	-	-	-	4	-	2	-	2	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-
Xiphinema pachtaichum (Xp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-
*Hoplolaimus indicus (*Hi)	-	-	-	-	-	-	2	-	3	-	2	-	3	-	4	-	-	-	2	-	2	-	-	-	2	-	3	-
Scutellonema bradys (Sb)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	2	-
Rotylenchus spp. (Rot)	3	-	2	-	2	-	2	-	4	-	1	-	4	-	4	3	-	-	-	-	-	-	2	-	4	-	4	-
Tylenchorhynchus spp. (Tyle*)*	3	-	1	-	-	-	7	-	3	-	4	-	3	-	6	-	3	-	-	-	1	-	-	-	5	-	7	-
Meloidogyne spp. (Mel*)*	-	-	-	-	2	-	3	4	4	2	3	3	6	4	4	5	3	-	1	1	-	-	3	-	5	2	3	-
Trichodorus spp. (Tri)	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	3	-	4	-	3	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1	-	1	-
Criconemoides spp.(Cri)	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
Hemicycliophora spp. (Hem)	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Longidorus spp. (Lon)	-	-	-	-	-	-	2	-	2	-	2	-	3	6	4	7	3	-	1	-	-	-	-	-	5	-	4	-

S : Sol ; R : Racines ; - : Absence de NP

Tableau 6. Densité des NPP des sols rhizosphériques (100 g) et de racines (20 g) des différentes régions agrumicoles étudiées.

	Souss-Massa						Marrakech-Safi						Beni Mellal-Khenifra				Gharb						Berkane					
	Balfa		Biogra		Taroudant		Souihla		Es Saada		Agafai		Souk Sebt		Guettaya		M'nasra		Allal Tazi		Sidi Slimane		Sidi Kacem		Zegzel		Aglmine	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
Tylenchulus semipenetrans (TS)	17	5	4	2	9	4	107	29	121	36	34	12	79	58	213	59	16	6	169	34	7	16	152	6	134	19	203	26
Pratylenchus spp. (Pra)	2	1	8	3	1	-	7	11	5	5	6	4	8	6	27	16	4	3	-	3	-	-	6	4	8	17	5	9
Pratylenchus vulnus (Pv)	-	1	-	-	-	-	5	2	-	2	4	4	5	9	8	2	2	-	-	-	-	-	-	3	4	-	3	4
Pratylenchus coffeae (Pc)	-	1	-	-	-	-	3	4	13	4	-	1	5	3	8	5	4	1	6	-	-	-	-	-	3	4	5	5
Pratylenchus thornei (Pt)	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-
Pratylenchus neglectus (Pn)	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	4	-
Paratylenchus spp. (Par)	3	1	-	-	2	-	-	4	5	2	3	2	5	5	4	3	-	-	-	-	-	-	4	4	3	2	-	3
Helicotylenchus spp. (Hel)	3	1	5	-	5	2	13	4	6	9	7	7	11	11	14	7	3	2	5	2	3	-	7	-	11	7	13	11
Tylenchus spp. (Tyl)	7	1	-	-	-	-	12	-	15	-	7	-	15	5	12	5	7	-	-	-	11	12	-	-	17	6	12	8
Xiphinema spp. (Xip)	1	1	2	-	-	-	5	-	3	-	11	-	5	-	13	5	2	-	2	2	-	3	3	-	11	-	4	-
Xiphinema diversicaudatum (Xd)	-	1	-	-	-	-	2	-	4	-	-	-	3	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	5	-
Xiphinema. americanum (Xa)	-	1	-	-	-	-	5	-	2	-	3	-	3	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-
Xiphinema pachtaichum (Xp)	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-
*Hoplolaimus indicus (*Hi)	-	1	-	-	-	-	2	-	3	-	2	-	3	-	5	-	-	-	5	-	2	-	-	-	2	-	4	-
Scutellonema bradys (Sb)	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	2	-
Rotylenchus spp. (Rot)	3	1	4	-	2	-	2	-	4	-	1	-	7	-	7	3	-	-	-	-	-	-	3	-	7	-	4	-
Tylenchorhynchus spp. (Tyle*)*	3	1	2	-	-	-	9	-	5	-	4	-	3	-	8	-	2	-	1	-	2	-	-	-	9	-	6	-
Meloidogyne spp. (Mel*)*	-	1	-	-	3	-	4	5	6	2	6	5	12	7	5	6	2	-	2	3	-	-	3	-	5	4	5	-
Trichodorus spp. (Tri)	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	4	-	4	-	3	-	-	-	2	-	-	-	2	-	2	-	1	-
Criconemoides spp.(Cri)	-	1	-	-	-	-	4	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
Hemicycliophora spp. (Hem)	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Longidorus spp. (Lon)	-	1	-	-	-	-	2	-	2	-	2	-	6	6	7	7	3	-	2	-	-	-	-	-	6	-	5	-

S : Sol ; R : Racines ; - : Absence de NPP

3. Caractérisation moléculaire des NPP

Afin de confirmer l'identification morphologique des espèces de NPP isolées dans le cadre de cette étude, la région D2D3 de l'ADNr 28S a été séquencée. Cette méthode est largement utilisée pour l'identification moléculaire des espèces et permet de fournir une preuve plus solide de l'identification des organismes étudiés. Les séquences D2D3 obtenues ont ensuite été comparées à des références de la base de données GenBank à l'aide du test BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Les résultats obtenus ont révélé que toutes les espèces isolées de NPP du même genre sont étroitement liées les unes aux autres en fonction de leur région D2D3 de l'ADNr 28S (**Figure 15**). Cela comprend les espèces de *Pratylenchus* (*P. vulnus, P. coffeae, P. thornei* et *P. neglectus*), *Scutellonema (S. bradys), Hoplolaimus (H. indicus)* et les espèces de *Xiphinema* (*X. diversicaudatum, X. americanum* et *X. pachtaichum*). Les résultats sont présentés dans le **Tableau 7** et la **Figure 15**, où il est possible d'observer une concordance étroite entre les différentes séquences D2D3 des NPP isolées.

Tableau 7. Numéro d'accession GenBank des nématodes identifiés.

Nématode	Région	Codes de collection des séquences d'ADN	Numéro d'accessions GenBank
Pratylenchus vulnus	D2D3	MOR-Be1-Pratylenchus	OM514901
		MOR-MS1-Pratylenchus	OM514898
		MOR-BK1-Pratylenchus	OM514899
		MOR-Gh1-Pratylenchus	OM514900
Pratylenchus coffeae	D2D3	MOR-MS2-Pratylenchus	OM514902
		MOR-BK2-Pratylenchus	OM514903
		MOR-Gh9-Pratylenchus	OM514904
		MOR-Be2-Pratylenchus	OM514905
Pratylenchus thornei	D2D3	MOR-Be4-Pratylenchus	OM514906
Pratylenchus neglectus	D2D3	MOR-Be6-Pratylenchus	OM514907
Scutellonema bradys	D2D3	MOR-BK15-Scutellonema	OM514920
		MOR-Gh10-Scutellonema	OM514921
		MOR-Be7-Scutellonema	OM514922
Hoplolaimus indicus	D2D3	MOR-MS6-Hoplolaimus	OM514916
		MOR-BK13-Hoplolaimus	OM514917
		MOR-Gh14-Hoplolaimus	OM514918

		MOR-Be10-Hoplolaimus	OM514919
Xiphinema diversicaudatum	D2D3	MOR-MS9-Xiphinema	OM514908
		MOR-BK3-Xiphinema	OM514909
		MOR-Be5-Xiphinema	OM514910
Xiphinema americanum	D2D3	MOR-MS7-Xiphinema	OM514911
		MOR-BK8-Xiphinema	OM514912
		MOR-Be16-Xiphinema	OM514913
Xiphinema pachtaichum	D2D3	MOR-BK5-Xiphinema	OM514914
		MOR-Be11-Xiphinema	OM514915

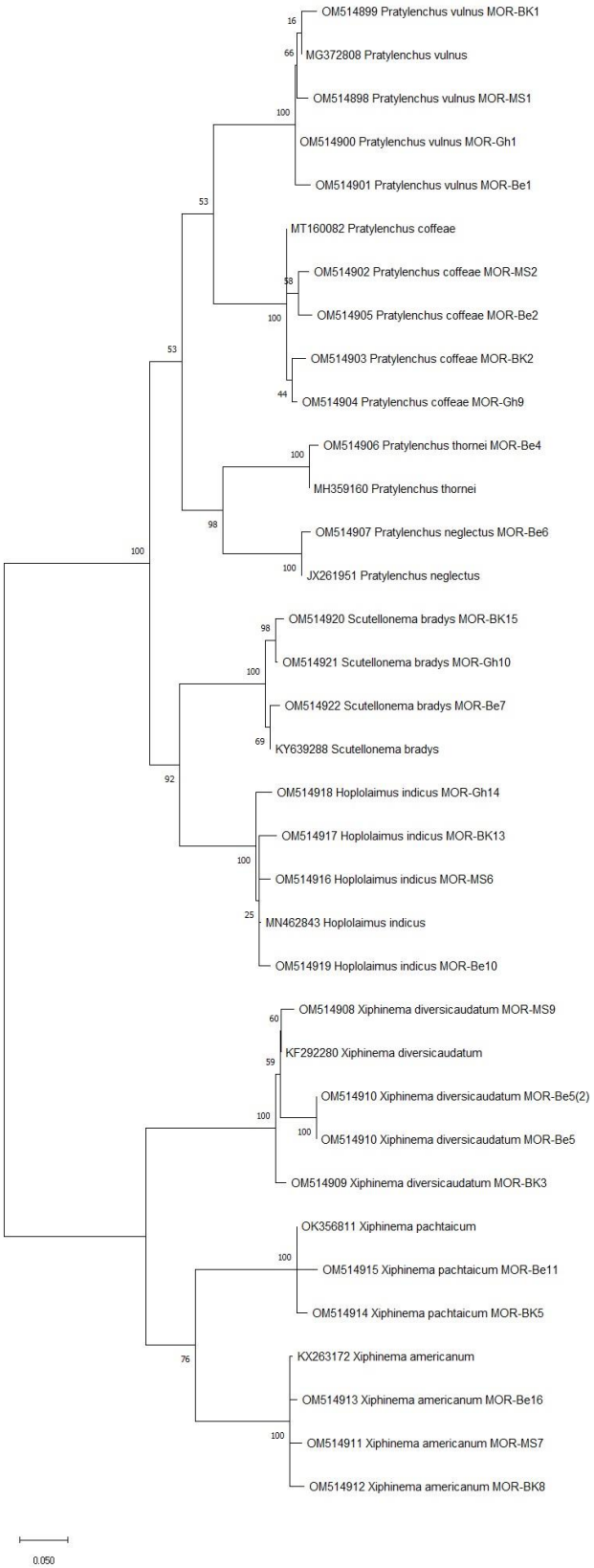


Figure 15. Arbre phylogénétique des NPP isolés de différentes régions agrumicoles marocaines obtenue par l'analyse des séquences nucléotidiques de la région D2D3 d'ADNr 28S à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance.

4. Analyse de la diversité des nématodes phytoparasites

a. Diversité taxonomique

La diversité des NPP en communautés a été évalué en utilisant l'indice de diversité Shannon-Winner (H'), l'indice de régularité Evenness (E) et le nombre total de nématodes (N) dans chacune des cinq régions agrumicoles étudiées (**Tableau 8**).

Les résultats ont montré des différences significatives ($p < 0,05$) entre les différentes régions agrumicoles étudiées en ce qui concerne l'indice de Shannon-Wiener (H'). Cependant, l'indice de régularité (Evenness) (E) n'a pas significativement varié entre les régions étudiées ($p > 0,05$). La région de Beni Mellal-Khenifra a enregistré le nombre le plus élevé de NPP avec une moyenne de 18,05, suivie par Marrakech-Safi (12,65), Berkane (3,69), Gharb (3,3), et enfin Souss-Massa (2,91). En ce qui concerne l'indice de Shannon, les valeurs les plus élevées sont observées à Marrakech-Safi (2,09), Gharb (2,05), et Beni Mellal-Khenifra (2,03), tandis que Berkane (1,4) et Souss-Massa (1,36) ont présenté des valeurs de diversité plus faibles. En termes d'équitabilité, les régions de Marrakech-Safi, Beni Mellal-Khenifra, Gharb et Berkane présentent des valeurs similaires, suggérant une distribution équilibrée des nématodes phytoparasites avec E = 0,84 ou 0,89.

Tableau 8. Diversité Shannon-Wiener (H'), Evenness (E) et nombre de NPP dans chacune des cinq régions d'agrumes étudiées.

Régions	Paramètres de diversité		
	Nombre de NPP *	Shannon-Winner (H')*	Evenness (*E*) *
Souss-Massa	2,91 c	1,36 b	0,7 a
Marrakech-Safi	12,65 b	2,09 a	0,84 a
Beni Mellal-Khenifra	18,05 a	2,03 a	0,88 a
Gharb	3,3 c	2,05 a	0,89 a
Berkane	3,69 c	1,4 b	0,84 a
p	<0,05	<0,05	>0,05

Les moyennes suivies des mêmes lettres dans la même colonne ne sont pas significativement différentes (tests de Tukey à $p < 0,05$).

5. Caractérisation physico-chimique de sol

Les résultats des analyses physicochimiques des sols rhizosphériques des agrumes au niveau des différentes régions étudiées sont présentés dans les **tableaux 9** et **10**.

L'analyse granulométrique des échantillons du sol a montré que la texture des sols a varié en fonction des régions étudiées et des différents sites au niveau de la même région. Une texture sablo-limoneuse a été observée dans divers sites de la région de Marrakech-

Safi, ainsi qu'à Balfa (Souss), Aglmine (Berkane) et Guettaya (Beni-Mellal). Une texture argilo-sableuse a été notée à Taroudant (Souss) et Zegzel (Berkane). Un sol limono-sablo-argileux a été observé à Biogra (Souss) et Sidi Slimane (Gharb). Enfin, une structure sableuse a caractérisé le sol à M'nasra et Allal Tazi (Gharb). (**Tableau 9**).

Le pH des sols varie entre 7,42 à Agafai (Marrakech) et 8,32 à Taroudant (Souss), indiquant que les sols sont légèrement alcalins à alcalins au niveau des différentes régions étudiées (**Tableau 9**).

L'humidité du sol a significativement varié en fonction des régions ($P < 0,05$). Le sol rhizosphérique de la région de Beni Mellal-Khenifra a présenté le taux d'humidité le plus élevé (28, 45%) au niveau de tous les sites étudiés, soit 3,41, 3,01et 2,02 fois plus élevé qu'au niveau des régions de Berkane (Zegzel), Gharb (Allal Tazi) et Souss (Balfa et Taroudant), respectivement (**Tableau 9**).

L'analyse statistique a montré que la conductivité électrique (CE) des sols rhizosphériques a varié significativement entre les différentes régions ($p < 0,001$) étudiées. Ainsi, la conductivité électrique la plus élevée a été notée au niveau de la région de Gharb Sidi Slimane (602,71µs/cm), soit environ 2,98 fois plus élevée que la plus faible CE (202,37µs/cm) notée au niveau de la région Beni Mellal (Souk Sebt) (**Tableau 9**).

Tableau 9. Texture, pH, humidité (H) et conductivité électrique (CE) des sols rhizosphériques des différentes régions agrumicoles étudiées.

Régions	Sites	Texture	pH	H (%)	CE (µs)
Souss-Massa	Balfa	Sablo-limoneux	7, 65	$14,49\pm0,11^{cdef}$	$317,43\pm10,67^{h}$
	Taroudant	Argilo-sableux	8,32	$14,08\pm1,74^{cdef}$	$228,33\pm23,12^{i}$
	Biogra	Loam sablo-argileux	7,86	$15,29\pm1,12^{cdef}$	$290,87\pm8,65^{h}$
Marrakech-Safi	Souihla	Sablo-limoneux	8,57	$17,70\pm1,80^{bcd}$	$545\pm 19,30^{b}$
	Es saada	Sablo-limoneux	8,27	$23,78\pm4,29^{b}$	$520,5\pm7,87^{b}$
	Agafai	Sablo-limoneux	7,42	$18,51\pm 2,71^{bcd}$	$538\pm2,94^{b}$
Beni Mellal-Khenifra	Souk Sebt	Limono-argileux	7,89	$28,45\pm3,35^{a}$	$202,37\pm0.67^{i}$
	Guettaya	Sablo-limoneux	7,03	$21,39\pm1,32^{b}$	$212,6\pm1,86^{i}$
Gharb	M'nasra	Sableux	7,43	$17,73\pm1,40^{bcd}$	$473,5\pm8,62^{cde}$
	Allal Tazi	Sableux	8,05	$9,43\pm1,47^{ef}$	$443,29\pm7,55^{ef}$
	Sidi Slimane	Loam sablo-argileux	7,81	$16,47\pm0,64^{cde}$	$602,71\pm21,35^{a}$
	Sidi Kacem	Sablo-limoneux	8,23	$18\pm2,16^{bcd}$	$411,45\pm8,62^{fg}$
Berkane	Zegzel	Argilo-sableux	8,13	$8,33\pm0,98^{f}$	$314,67\pm 5,85^{h}$
	Aglmine	Sablo-limoneux	7,59	$12,14\pm1,35^{def}$	$373,43\pm2,38^{g}$

Les moyennes suivies des mêmes lettres dans la même colonne ne sont pas significativement différentes (tests de Tukey à $p < 0,05$).

Les teneurs en carbone organique total (COT) et en matière organique (MO) ont varié significativement entre les différentes régions ($p < 0,001$). En effet, la teneur la plus

élevée en COT (3,21%) a été enregistrée au niveau de Taroudant région de Souss-Massa, soit environ 13,95 fois plus que le taux de COT le plus faible noté à Es saada au niveau de Marrakech- Safi (**Tableau 10**). De même, la teneur la plus élevée en MO (5,53%) a également été observée à Taroudant, soit environ 14,19 fois supérieure à la teneur la plus faible observée à Es Saada, Marrakech

Des variations significatives ($p < 0,003$) de la teneur en phosphore total (PTo) ont été observées entre les différentes régions étudiées et entre les différents sites au sein de la même région. Les sites Balfa de la région de Souss, Souihla de la région de Marrakech, Sidi Slimane de la région de Gharb et Aglmine dans la région de Berkane ont présenté des teneurs élevées en PTo par rapport aux autres sites (**Tableau 10**). La teneur la plus élevée en phosphore total a été enregistrée au niveau de la région du Gharb à Sidi Slimane (26, 33 mg/g de sol), alors que la teneur la plus faible a été enregistrée à Souihla dans la région de Marrakech (11,92 mg/g de Sol).

L'analyse de la teneur en phosphore assimilable des différents échantillons de sol ont montré que les teneurs en phosphore assimilable ont varié d'une manière significative en fonction de la région ($P <0,005$). En effet, la région de Gharb a présenté la teneur la plus élevée en phosphore assimilable (8,85g /kg) au niveau de Sidi Kacem et la teneur la plus faible (0,94 g/kg) au niveau d'M'nasra.

L'analyse des autres éléments nutritifs a montré que les teneurs en potassium (K+), calcium (Ca), sodium (Na), et Azote (N) ainsi que la teneur en calcaire total ont varié de manière significative en fonction de la région et des sites étudiés ($P <0,005$). En effet, la région de Gharb a présenté les teneurs les plus élevées en K^+ (> 118 g/kg) sauf au niveau des sites de M'nasra et Allal Tazi. La teneur la plus élevée en Ca^{2+} a été notée au niveau de la région du Gharb (525,87 g/kg), soit environ 5,69 fois plus élevée que la teneur la plus faible (92,3 g/kg) qui a été notée au niveau de Souihla à Marrakech. En ce qui concerne le Na^+, sa teneur a varié entre 82,81g/kg à Taroudant dans la région de Souss-Massa et 27,63 g/kg à Zegzel au niveau de la région de Berkane. Quant à l'azote (N), sa teneur a oscillé entre 10,27g/kg à Taroudant dans la région de Souss-Massa et 4,67g/kg à Zegzel dans la région de Berkane. (**Tableau 10**). La région du Gharb a enregistré le taux de calcaire le plus élevé, soit 61,40% et 57,89% au niveau de Sidi Slimane et Sidi Kacem, respectivement. En revanche, la région de Souss Massa a présenté le taux de calcaire le plus faible, soit 15,57% au niveau de Biogra et 19,74% au niveau de Belfa (**Tableau 10**).

Tableau 10. Teneurs en carbone organique total, matière organique, en éléments nutritifs et en calcaire des sols étudiés.

Régions	Sites	COT (%)	MO (%)	P To. (mg/g)	P As. (mg/g)	K (g/kg)	Ca (g/Kg)	Na (g/Kg)	N (%)	Calcaire (%)
Souss-Massa	Balfa	2,4 ± 0,08b	4,14 ± 0,13b	24,45±0,80abc	8,61±1,12a	82±1,24e	220,33±5,19b	35,2±1,16e	8,4±1,74ab	19,74±0,62c
	Taroudant	3,21 ± 0,03a	5,53 ± 0,10a	13,25± 0,51d	5,12±0,25b	90,1±4,38cd	107,77±4,41ef	82,81±0,39a	10,27±1,90a	21,49±2,79c
	Biogra	1,65± 0,02bcd	2,54±0.17d	14,03 ±0,83cd	3,17±1,27ab	92,5±1,22d	112,67±3,83e	58,1±6,60cd	7,94±1,91b	15,57±1,59c
Marrakech-Safi	Souihla	0,6 ±0,34ghi	1,06 ±0,04ef	11,92 ±2,98e	1,33±0,29c	66,30±2,98fg	92±7,03f	28±2,62e	6,54±2,6bc	19,73±2,84c
	Es saada	0,23 ±0,08i	0,39 ±0,10h	14,78 ±1,42cd	4,17±1,09b	71,4±2,41f	105,33±3,31ef	31,13±5,44e	10,27±1,90a	30,87±9,75c
	Agafai	0,31 ±0,08i	2.03± 0,16d	15,62 ±4,18cd	1,84±0,49c	58,47±0,62g	139±8,21d	82,43±0,72a	7,003±3,49b	38,59±2,17bc
Beni Mellal-Khenifra	Souk Sebt	1,47 ± 0,03cd	2,53 ± 0,05d	16,59±1,95bcd	4,01±0,03b	72,2±2,33f	100,3 1,4ef	80,4±3,44a	8,88±1,66ab	35,53±1,8bc
	Guettaya	1,99 ± 1,07b	3,43 ± 0,11c	19,39±1,61abcd	3,19±0,24ab	90,63±2,29cd	114±2,94e	70,67±1,11ab	9,81±1,74ab	29,38±6,2c
Gharb	M'nasra	0,89 ± 0,05 fg	1,53 ± 0,15e	14,7±1,42cd	0,94±0,11c	35,6±0,49h	219,72±4,65b	60,97±3,25bcd	6,54±2,68bc	35,09±1,89bc
	Allal Tazi	0,87 ±0,1fgh	1,50 ± 0,12e	14,26± 0,51cd	1,27±0,14c	43,57±3,82h	175,67±8,84c	67,07±0,47bc	7,001± 0,66b	37,72±3,18bc
	Sidi Slimane	0,46± 0,32hi	0 ,8± 0,40fg	26,33±3,60a	7,9±2,19a	201,37±2,29a	525,87±3,02a	55,29±4,71d	9,8±1,74ab	61,40±1,99a
	Sidi Kacem	1,62 ± 0,05 bcd	2,79 ± 0,15d	25±2,82ab	8,85±0,22a	118,96±5,28b	130,61±1,01de	81,87±0,75a	7,94±2,31b	57,89±2,23ab
Berkane	Zegzel	1,04±0,11de	1,8±0,14de	20,53±3,87abc	8,25±4,57a	37,2±1,32h	100,3ef	27,63±1,89e	4,67±2,49c	23,68±2,23b
	Aglmine	1,81±0,12bc	2,03±0,26d	14,36±1,20c	3,77±0,93ab	35,2±3,96h	136,63 3,51d	79,37±1,87a	5,61±3,30c	29,38±2,17b

Les moyennes suivies des mêmes lettres dans la même colonne n'indiquent aucune différence significative (tests de Tukey à $p < 0.05$).

6. Interactions entre les paramètres physico-chimiques et nématologiques de sol

Les résultats de l'analyse des corrélations entre les caractéristiques physico-chimiques et nématologiques des différents sols étudiés sont consignés dans la **Figure 16.**

Les résultats de l'analyse en composantes principales ont révélé que les deux premiers axes expliquent respectivement 24,90 % et 21,84 % de la variance totale (valeurs propres). L'axe 1 est associé principalement au sodium (Na) ainsi qu'aux nématodes *Longidorus* spp., *Helicotylenchus* spp. et *T. semipenetrans*, tandis que l'axe 2 est davantage lié au calcium (Ca) et au nématode *Tylenchorhynchus* spp. Le graphique de chargement des facteurs du sol a montré que l'axe PC1 est positivement corrélé au pH et à l'humidité et négativement corrélé à l'azote et à la conductivité électrique (EC). De son côté, l'axe PC2 est positivement corrélé aux éléments minéraux, notamment le calcium (Ca), le sodium (Na), le potassium (K) et la matière organique (OM), alors qu'il est négativement corrélé à l'EC et à l'azote. L'analyse bi-plot des facteurs du sol en interaction avec les communautés de nématodes des agrumes a clairement montré que *Trichodorus* spp., *H. indicus*, *Longidorus* spp. et *Tylenchus* spp. sont associés à l'humidité et au pH, tandis que *T. semipenetrans*, *X. americanum*, *Pratylenchus* spp. et *Helicotylenchus* spp. sont particulièrement associés au calcium, au sodium et au potassium. Enfin, les genres *Meloidogyne*, *Pratylenchus* (*P. thornei*, *P. coffeae*, *P. vulnus* et *P. neglectus*) et *Xiphinema* sont associés à la texture et à la teneur en phosphore (P) du sol. Dans l'ensemble, la plupart des NPP ont montré une association négative avec le carbone et la matière organique.

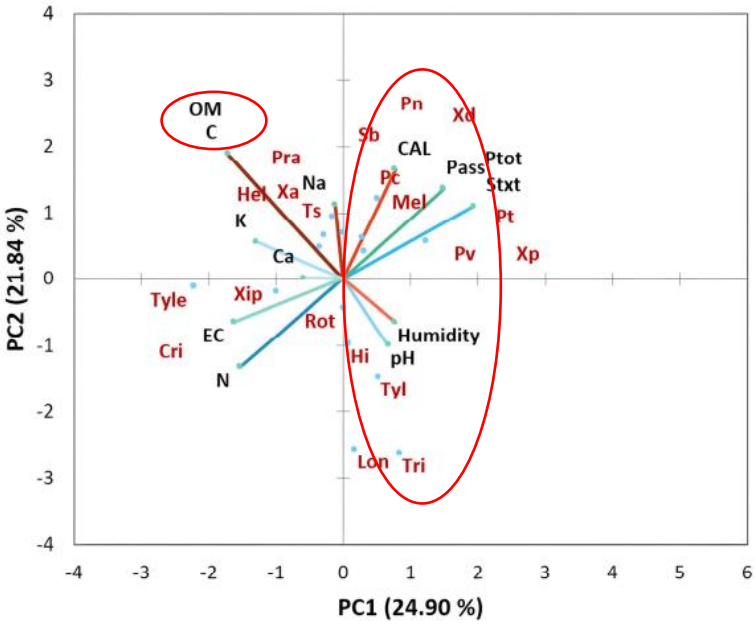


Figure 16. Analyse en composante principale des paramètres physico-chimiques de sols en interaction avec les nématodes phytonématologiques des agrumes des différentes régions étudiées.

IV. DISCUSSION

1. Distribution et diversité des NPP

Pour mieux comprendre la distribution des NPP associés à la rhizosphére des agrumes au Maroc, des enquêtes approfondies ont été menées dans les principales régions productrices d'agrumes du pays. Sur la base des caractéristiques morphologiques et morphobiométriques, onze genres et dix espèces de NPP ont été identifiés. *T. semipenetrans* était l'espèce la plus commune et la plus abondante dans tous les vergers d'agrumes étudiés, confirmant ainsi les résultats d'autres travaux réalisés au niveau d'autres régions productrices d'agrumes au Maroc (Mokrini *et al*. 2018) et dans le monde entier, notamment en Iran (Eisvand *et al*., 2019), en Égypte *(*Abd-Elgawad *et al*., 2016; Abu Habib *et al*., 2020) et en Espagne (Sorribas *et al*., 2008). En effet, *T. semipenetrans* a été le nématode le plus prédominant dans les régions de Souss-Massa (Taroudant) (100%), Gharb (M'nasra) (100%), Marackech-Safi (Souihla) (83,3%), Berkane (Aglmine) (81,8%) et Beni et Mellal-Khenifra (Guettaya) (66,7%). Cette espèce est remarquable non seulement pour son association étroite avec les agrumes, mais aussi pour la capacité des agrumes à supporter des populations très élevées sans entraîner immédiatement de symptômes. La large distribution de *T. semipenetrans* pourrait être attribuée à de nombreux facteurs dont, l'irrigation et la mécanisation facilitant le déplacement du sol ainsi que des résidus végétaux infestés d'un endroit à un autre (Abd-Elgawad *et al*., 2016). En outre, la grande variabilité des genres de NPP observée dans cette étude peut être attribuée à la variation des facteurs écologiques et édaphiques entre et au sein des différentes régions étudiées (Abu Habib *et al*., 2020).

Après *T. semipenetrans*, *Helicotylenchus* s'est révélé être le genre le plus répandu, avec une variabilité allant jusqu'à 80% à Souihla dans la région de Marrakech-Safi. Ce nématode a été largement observé au Maroc, infectant diverses cultures. Il a été trouvé dans les tunnels de culture de framboise (*Rubus idaeus*) (Mokrini, *et al*., 2019), les vignobles (*Vitis vinifera*) (Mokrini, 2019), les champs de safran (*Crocus sativus*) (Mokrini, *et al*., 2019), et les vergers d'agrumes (Mokrini *et al*., 2018b). La prévalence de ce genre a été plus élevée dans les vergers d'agrumes marocaines par rapport à l'Espagne (Sorribas *et al*., 2008) et l'Egypte (Abu Habib *et al*., 2020). Par ailleurs, Kumar and Das (2019) ont signalé une prévalence plus élevée d' *Helicotylenchus dihystera* (80%) à Tinsukia. Quatre espèces du genre *Pratylenchus* spp. (*P. vulnus*, *P. thorne*i, *P. neglectus*, *P. coffeae*) ont été identifiées dans les régions étudiées. La densité de population de ce genre dans le sol rhizosphérique a varié de 5 à 11 nématodes par 100 g de sol à Gharb et Beni Mellal-Khenitra,

respectivement, alors que celle des racines a varié de 7 à 11 nématodes par 20 g de racines à Berkane et Souss-Massa, respectivement. Plusieurs études ont signalé la présence de ces espèces de nématodes dans les vergers d'agrumes du monde entier. Au Brésil, l'espèce *P. coffeae* infeste environ 1% des pépinières et des vergers d'agrumes (De Campos *et al*., 2002), alors qu'elle est considérée comme un problème majeur en Floride et aux Etats-Unis (O'Bannon and Tomerlin, 1973). D'autres espèces de nématode de lésions racinaires ont été décrites comme importantes, telles que *Pratylenchus vulnus* et *P. neglectus* en Israël (Bucki *et al*., 2020) et en France (Garcia *et al*., 2022), et *P. coffeae* au Maroc. Ces espèces peuvent réduire de manière significative la biomasse racinaire, ce qui se traduit par des pertes importantes du rendement (Abd-Elgawad 2020; Mokrini *et al*. 2019 a, b).

Le genre *Xiphinema* est considéré comme l'un des dix NPP les plus importants économiquement (Jones *et al*., 2013). Ce genre pose des problèmes majeurs à l'agriculture biologique en Égypte (Adam *et al*., 2013), ainsi qu'à la production de framboises et d'agrumes au Maroc (Mokrini *et al*., 2014; Mokrini *et al*., 2019), et de cultures maraîchères en Arabie Saoudite (Al-Hazmi *et al*., 1983). Ce nématode ectoparasite migrateur est particulièrement problématique car il peut abriter et transmettre des virus végétaux (Jones *et al*., 2013) tels que le virus de la mosaïque de l'Arabis (ArMV) (Jha and Posnette, 1961) et le virus des taches en anneaux du tabac (Tobacco ring spot virus, TRSV) (McGuire, 1973). Ainsi, même à faible densité, ces espèces de nématodes peuvent causer des dommages significatifs aux plantes (Hewitt *et al*., 1958; Fisher and Raski, 1967). Les différentes espèces de *Xiphinema* identifiées dans cette étude présentent une répartition variable selon les régions productrices d'agrumes étudiées. *X. pachtaichum* a été observée à Beni Mellal-Khenifra (6,7 %) et à Berkane (6,3%), tandis que *X. diversicaudatum* a été rencontré dans les régions de Marackech-Safi (13,3%), Beni Mellal-Khenifra (16,7%), et Berkane (13,6%). Cette espèce de nématode a été signalée pour la première fois au Maroc en mai 2012 dans la région du Gharb par Mokrini *et al*. (2014). Ce nématode est capable de transmettre le virus de la mosaïque Arabis, qui est principalement associé à la maladie de la dégénérescence des feuilles de la vigne (Mokrini *et al*. 2014). Enfin, *X. americanum* a été détectée dans les régions de Marrakech-Safi (20 %), Beni Mellal-Khenifra (10%) et Berkane (3,1%). Cette espèce de nématode n'avait jamais été signalée auparavant comme parasite des agrumes. L'identification moléculaire a permis de détecter et d'identifier avec précision cette espèce de nématode. Cette découverte souligne l'importance de la

surveillance continue et de l'utilisation de méthodes de diagnostic précises pour identifier les parasites émergents et prévenir leur propagation dans les cultures agricoles.

Le nématode à galles *Meloidogyne* spp. attaquant les agrumes n'a pas été fréquemment obsorvé lors de la présente étude. En effet, seuls quelques vergers d'agrumes ont été trouvés infestés par ce genre, avec des taux de prévalence de 38,9 %, 33,3 %, 26,7% 20 % et 15,6% dans les régions de Marrakech-Safi (Es Saada), Souss (Taroudant), Beni Mellal-Khenifra (Souk Sebt), Gharb (M'nasra et Allal Tazi) et Berkane (Zegzal), respectivement. La prévalence du genre *Meloidogyne* au niveau de ces vergers d'agrumes était inférieure à celle observée dans les vergers d'agrumes égyptiens cultivés avec des plants de tomates en intercalaire (Hammam *et al*., 2021). Plusieurs études à Taiwan et en Inde ont signalé que *Meloidogyne* spp. pouvait provoquer des galles allongées sur les racines des agrumes (Duncan, 2009). En outre, certaines espèces de *Meloidogyne* par exemple, *M. incognita*, *M. javanica* et *M. arenaria* ont été trouvées au niveau de la rhizosphère de *Citrange Troyer* et de bigaradier, provoquant de petites galles sans activité de reproduction de nématode (Baines *et al*., 1959).

Les résultats de cette étude ont révélé la présence de divers autres types de nématodes dans les vergers d'agrumes examinés, en particulier, les genres *Longidorus, Trichodorus, Tylenchorhynchus, Criconemoides*, et *Rotylenchus* qui ont également été détectés dans d'autres plantations d'agrumes à travers le monde, notamment en Egypte (Hammam *et al*., 2021), en Espagne (Sorribas *et al*., 2008), à Tinsukia (Kumar and Das, 2019) et au Maroc (Mokrini *et al*., 2018a).

Lors de cette étude, les espèces *Scutellonema bradys* et *Hoplolaimus indicus* ont été trouvées à de faibles densités variant entre 2 et 4 nématodes/100 g de sol et entre 2 et 5 nématodes/ 100 g de sol, respectivement. Kumar and Das (2019) ont rapporté que l'espèce *Hoplolaimus indicus* a été très abondante dans les vergers d'agrumes à Tinsukia, tandis qu'elle a été la moins abondante dans la région de Marackech-Safi (Souihla) (6,7%). Par ailleurs, le genre *Hemicycliophora* n'a été observé que dans 5% des parcelles d'agrumes échantillonnées, avec une densité moyenne de 2 nématodes/100 g de sol. Ces résultats concordent avec les recherches de Shanmugam *et al*. (2021), qui ont constaté que ce genre était moins répandu dans certaines mauvaises herbes, arbustes et herbes indiens. L'ampleur des dommages causés par ce nématode aux cultures d'agrumes n'a pas encore été documentée (Abd-Elgawad, 2020).

Les résultats obtenus à partir de l'analyse des indices de diversité de Shannon (H') et de régularité (E) ont permis de constater que les régions de Marrakech-Safi, Gharb et Beni Mellal-Khenifra ont présenté les valeurs les plus élevées, indiquant une plus grande diversité et une répartition plus équitable des espèces de nématodes. En revanche, la région de Souss Massa a présenté les indices les plus faible. Ces résultats suggèrent que la répartition des espèces de nématodes pourrait être influencée par des facteurs environnementaux et agricoles spécifiques à chaque région. Cette observation est cohérente avec l'étude menée par Nisa *et al*. (2021), qui a démontré que les sols des zones forestiers sont plus propices aux nématodes et affichent un niveau de santé du sol supérieur à celui d'autres zones de sol.

2. Interaction entre les communautés de NPP et les facteurs physico-chimiques du sol

La compréhension de l'interaction entre les propriétés physicochimiques du sol et les NPP est essentielle pour une gestion efficace et respectueuse de l'environnement. La population de *T. semipenetrans* a été positivement corrélée avec les teneurs en éléments minéraux du sol (K, Ca, Na et C). Une forte corrélation a été trouvée entre ces paramètres et la prévalence de *T. semipenetrans* dans les zones de culture des agrumes en Espagne (Sorribas *et al*., 2008). La teneur en phosphore était positivement corrélée à la présence de *Meloidogyne* spp, *Xiphinema* spp et *Pratylenchus* spp. (*P. thornei, P. vulnus,* et *P. neglectus*). Les résultats concordent avec une étude antérieure de Nisa *et al*. (2021) qui ont également signalé une corrélation positive entre l'abondance des nématodes et la teneur en phosphore du sol. Dans cette étude, la plupart des NPP identifiés ont montré une corrélation négative avec la matière organique et le carbone du sol. Le pH du sol a été identifié comme un facteur important dans l'abondance des nématodes des agrumes. Des études antérieures, telles que celles menées par Wang *et al*. (2009) et Spann and Schumann (2010), ont montré que les sols à faible pH favorisent une augmentation de l'abondance et de la diversité des nématodes. Cependant, des recherches telles que celles de Norton (1989), Cadet *et al*. (1994) et Korthals *et al.* (1996) ont révélé que les sols à pH acide encouragent la prolifération du nématode à galles *Meloidogyne* spp. D'autre part, Salahi Ardakani *et al*. (2014) ont observé une plus grande abondance de *T. semipenetrans* dans les sols à pH alcalin. En outre, Van Gundy and Martin (1962) ont constaté que la densité de *T. semipenetrans* dans le sol des agrumes était quatre fois plus élevée dans les sols neutres que dans les sols acides.

La texture et la structure du sol ont un impact important sur la distribution et la mobilité des nématodes du sol. D'après nos résultats, les sols de texture sablo-limoneux ont une influence positive sur la répartition de la plupart de nématodes phytoparasites des agrumes. Dans une étude récente, Laasli *et al*. (2022) ont constaté que certains nématodes, tels que *Aphelenchoides* spp, *Merlinius* spp et *Pratylenchus* spp, étaient associés aux sols sableux et limoneux dans les champs de blé, tandis que d'autres, tels que *Longidorus* spp. et *Xiphinema* spp., étaient plus fréquents dans les sols riches en argile. Les résultats de Mokrini *et al*. (2019a) ont également montré que l'abondance de plusieurs nématodes phytoparasites affectant les framboises était étroitement liée à la granulométrie du sol. De plus, Kim *et al*. (2017) ont suggéré que les sols sableux favorisent la croissance des nématodes tels que *M. incognita* en stimulant leur mobilité et leur activité alimentaire.

V. CONCLUSION

Ce chapitre met en évidence la diversité des NPP au niveau des principales régions productrices d'agrumes au Maroc. Nos résultats ont montré que *Tylenchulus semipenetrans* est l'espèce la plus abondante dans les matrices du sol et des racines des différentes régions étudiées. Ceci est probablement dû au fait que les conditions environnementales et pédologiques locales sont plus propices à sa croissance. D'autres espèces de nématodes économiquement importantes ont été détectées telles que *Pratylenchus vulnus*, *Pratylenchus thornei*, *Scutellonema bradys*, *Helicotylenchus indicus*, et *Xiphinema diversicaudatum* ainsi que *X. Americanum*, signalé pour la première fois dans les vergers d'agrumes marocains. Cette espèce de NPP est connue pour être un vecteur de virus et sa présence dans les vergers d'agrumes marocains pourrait avoir des conséquences graves sur la production agrumicole nationale. Les résultats ont révélé une interaction étroite entre les paramètres physicochimiques et nématologiques du sol. L'analyse des indices de diversité des NPP dans les différentes régions étudiées a révélé que les régions de Marrakech-Safi, Beni Mellal et Gharb présentent une diversité de nématodes plus élevée que celle de Souss et Berkane. Ces résultats indiquent que la diversité des nématodes est influencée par le facteur site. Cependant, il est important de noter que d'autres facteurs tels que la saison, les variétés porte-greffes et la présence de cultures associées aux agrumes pourraient également avoir une incidence sur la diversité des nématodes phytoparasites.

CHAPITRE III

ÉVALUATION DE LA VARIATION SAISONNIERE DES PRINCIPAUX NÉMATODES PHYTOPARASITES ASSOCIES AUX AGRUMES DANS LA REGION DE MARRAKECH –SAFI

I. INTRODUCTION

La variation saisonnière des populations des NPP a été largement documentée chez diverses cultures végétales. Il a été montré que les caractéristiques du sol tels que le pH (Kawanobe *et al*. 2020), l'humidité (Daramola *et al*., 2021), ainsi que la teneur en matière organique et en éléments minéraux (Dabiré *et al*., 2007. Nisa *et al*. 2022) ont une influence considérable sur la communauté des NPP. Il a aussi été révélé que les variations des paramètres physico-chimiques des sols au fil des saisons ont un impact significatif sur la densité et la structure de la communauté des nématodes phytoparasites (Dabiré *et al*., 2007; Dababat *et al*. 2019; Kawanobe *et al*. 2020; Daramola *et al*. 2021).

Les rares études dédiées à l'investigation des populations des NPP associées aux cultures d'agrumes se sont surtout intéressées à l'étude de leur distribution et de leur impact négatif sur la croissance et le rendement de ces arbres fruitiers (Abokorah and Elsebaay, 2022; Ahmed *et al*., 2022). Cependant, on ne trouve pas dans la littérature de données sur la dynamique des populations des NPP associés à la rhizosphère des agrumes en fonction des saisons de l'année et des paramètres physicochimiques et biologiques du sol. Il est donc nécessaire de développer les connaissances sur la bioécologie de ces parasites, en particulier sur les fluctuations des populations des NPP et les principaux facteurs qui les régulent, afin de pouvoir raisonner et orienter les programmes de lutte contre ces phytoparasites. Ces programmes de lutte doivent prendre en compte les conditions agronomiques, pédoclimatiques et les pratiques culturales, telles que le site de culture, la présence et le type des cultures associées, etc. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est d'analyser la dynamique saisonnière des populations de NPP associés à la rhizosphère des agrumes en relation avec les variations saisonnières, les conditions agronomiques et les pratiques culturales au niveau des principaux vergers agrumicoles de la région de Marrakech. Les travaux seront orientés vers l'étude de l'effet des conditions pédoclimatiques (variations saisonnières) et des pratiques culturales (irrigation, fertilisation, cultures associées, etc) sur la densité et la diversité des NPP chez différentes variétés porte-greffes au niveau de trois sites de la région de Marrakech, domaine Graoua, domaine Benkebboura, et jardin Arsat Moulay Abdessalam. Ceci nous permettra de mieux comprendre comment ces facteurs peuvent influencer la densité et la répartition des NPP au fil des saisons afin de développer des stratégies de gestion des NPP adaptées à ces environnements.

Les questions scientifiques qu'on s'est posées dans ce chapitre sont : Les variations saisonnières et les pratiques culturales impactent-elles la diversité et la distribution des

NPP dans le sol et leur capacité à infester les racines des agrumes ? Cet impact s'exercerait-il à travers l'action sur les propriétés physico-chimiques du sol ?

II. MATERIELS ET METHODES

L'organigramme général de la méthodologie suivie dans cette étude est comme suite :

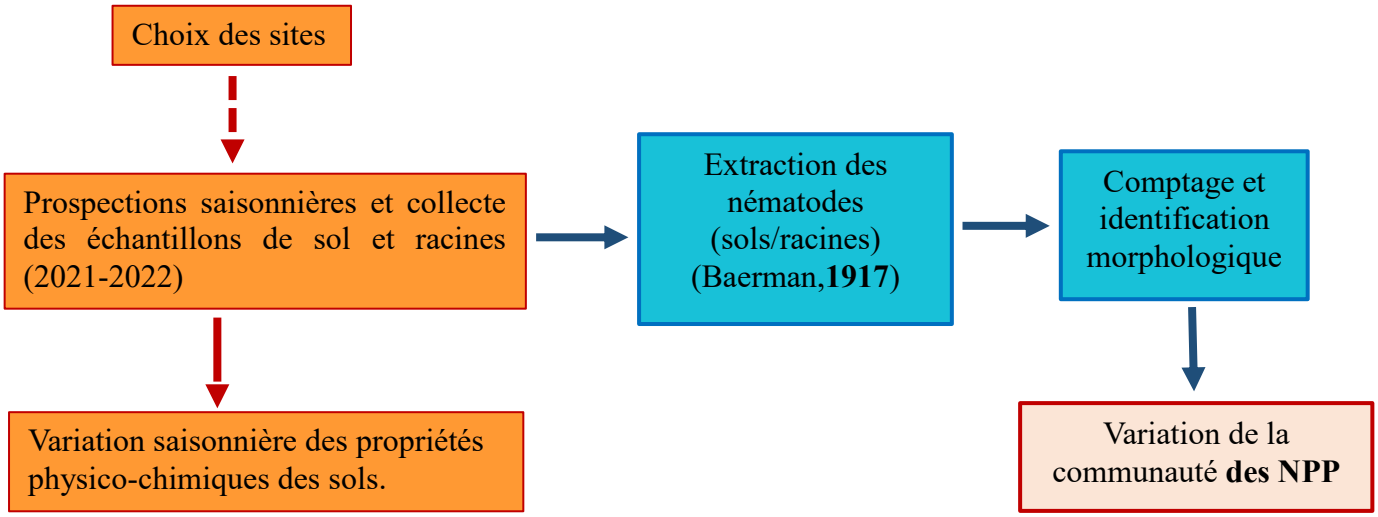


Figure 17. Organigramme général des procédures suivies au cours de ce chapitre.

1. Site et période d'étude

La présente étude a été menée au niveau de trois sites agrumicoles utilisant des pratiques culturales différentes dans la région de Marrakech-Safi, Domaine Graoua, Domaine Benkebboura, et jardin Arsat Moulay Abdessalam (**Figure 18**). Les échantillons de sol rhizosphériques et de racines ont été collectés pendant les saisons du printemps (Avril 2022), d'été (Juillet 2022), et d'automne (Novembre 2022), chez quatre espèces de porte greffes différentes, Bigaradier, Citrange Troyer, Volkameriana et Citrange Carrizo.

Le domaine Graoua (31°35'17.0"N 7°55'08.8"W) est un verger qui s'étale sur une surface de 254 hectares comportant des arbres de 4 à 5 m de hauteur et un écartement de 6m×4m. Les pratiques culturales consistent entre autres en l'application des fertilisants et des traitements phytosanitaires particuliers. L'irrigation est menée par goutte à goutte, servant également à l'application des fertilisants (fertigation). Il n'y a pas de cultures associées au sous-bois des agrumes dans cette station. Les porte-greffes utilisés dans ce domaine comprennent

Citrus aurantium (Bigaradier), *Citrus volkameriana* (Volkameriana), ainsi que les variétés de Citrange : Troyer, Carrizo et Citrange-35.

Le domaine Benkebboura (31°35'16.1"N 7°44'11.3"W) abrite des agrumes de 3 à 5 m de hauteur et plantés sur une surface de 8 ha. Avec un écartement de plantation de 6m×4m. Le verger est aussi conduit d'une manière moderne ou les arbres reçoivent des traitements phytosanitaires et amendement. L'irrigation est menée par goutte à goutte servant également à l'application du plan de fertilisation. Certaines cultures annuelles comme l'oignon et la pomme de terre, bénéficiant également des traitement fertilisants et sanitaires, sont souvent associées aux agrumes dans ce verger où *Citrus aurantium* (Bigaradier) et *Citrus volkameriana* (Volkameriana) sont utilisés comme porte-greffes.

Le jardin Arsat Moulay Abdessalam (31°37'37.8"N 8°00'01.1"W), s'étend sur une superficie de 8 ha, où les arbres d'agrumes plantés avec un espacement de 6m. Ce verger est conduit d'une manière traditionnelle, sans aucune application de fertilisants, traitements phytosanitaires, ou d'amendements. L'irrigation est effectuée selon les saisons, une à deux fois par semaine, de la même manière pour les diverses plantes du jardin sans tenir compte des besoins spécifiques des agrumes. Aucune culture n'est associée aux sous-bois des arbres d'agrumes dans ce verger. Le porte-greffe utilisé est exclusivement le *Citrus aurantium* (Bigaradier).

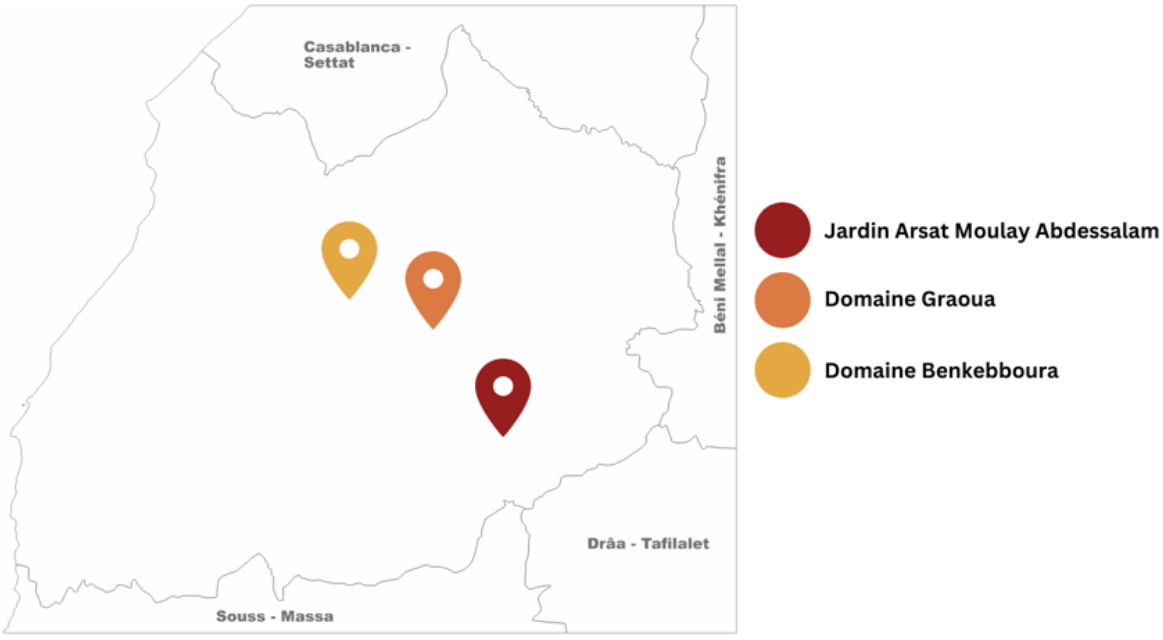


Figure 18. Localisation des sites agrumicoles étudiés

2. Paramètres phytonématologiques

La méthode d'échantillonnage des sols et des racines utilisées dans cette étude est la même que celle décrite en détails dans le premier chapitre (**voir sous-section 2**). Les nématodes ont été extraits des sols et des racines en utilisant la technique de Baerman (1917) (**voir chapitre I, sous-section 3, a**), et leur identification a été réalisée au laboratoire de nématologie à l'INRA de Rabat (**voir chapitre I, sous-section 3, a**). La prévalence, l'intensité et la densité des NPP associés aux racines et aux sols rhizosphériques des agrumes dans les différents sites prospectés ont été déterminées (**voir chapitre I, sous-section 3, a**).

3. Paramètres physico-chimiques du sol

Les caractéristiques physico-chimiques des sols rhizosphériques des agrumes collectés des différents sites prospectés, notamment leurs teneurs en carbone et en matière organique (méthode d'Anne décrite par Aubert, 1978), en azote (méthode de Kjeldahl modifiée par Barbano *et al*., 1990), ainsi qu'en phosphore total et assimilable (méthode d'Olsen *et al*. 1983) ont été déterminées. Ces différentes analyses ont été réalisées au laboratoire d'Agrobiotechnologie et de Bioingénierie à la FST, Marrakech, comme décrit dans la **sous-section 5 du chapitre I**.

4. Analyses statistiques

Les données quantitatives ont fait l'objet d'une analyse de variance (ANOVA) et d'une comparaison de moyenne (tests à plages multiples de Tukey au seuil de 5%). De même, les corrélations entre différents paramètres ont été déterminées en calculant les coefficients de corrélation de Pearson. Les logiciels informatiques utilisés sont GraphPad Prism 8.0.1 et SPSS (Version 25).

III. RESULTATS

1. Inventaire taxonomique de la nématofaune phytoparasite des agrumes

L'étude menée sur les NPP associés aux racines et aux sols rhizosphériques des agrumes au niveau des trois sites étudiés a permis d'établir un inventaire global de 18 genres et 6 espèces de NPP appartenant à l'embranchement des Nematoda, classes des *Chromadorea, Secernentea, Tylenchoidea, Enoplea* et *Dorylaimea*. La diversité des NPP a nettement varié en fonction des saisons et des sites étudiés. En effet, la saison printanière a enregistré la diversité la plus élevés au domaine Graoua avec 16 espèces et/ou genres de NPP suivi du domaine Benkebboura avec 12 espèces/genres de NPP contre respectivement 12 et 8 espèces/genres de NPP en été (**Tableau**

11). En revanche, c'est en automne qu'Arsat Moulay Abdesslam a présenté la diversité la plus élevées (13 espèces/genres de NPP), alors que la divesité la plus faible (9 espèces/genres de NPP) a été notée en été (**Tableau 11**). L'ordre des *Tylenchida* est le plus représenté dans tous les sites quelle que soit la saison étudiée.

Certains NPP sont présents pendant les trois saisons au niveau de tous les sites tels que *T. semipenetrans*, *Helicotylenchus* spp., *Pratylenhus* et *Xiphinema* spp. En revanche, au cours des saisons (du printemps à l'été), on observe la disparition de certains NPP dans certains sites et l'apparition d'autres. Par exemple, *Tylenchus* spp. et *Ditylenchus dipsaci* sont rencontrés pendant les trois saisons au niveau du domaine Graoua, alors qu'ils ne sont observés qu'au printemps et en automne au domaine Benkebboura et à Arsat Moulay Abdesslam. L'espèce *Pratylenchus coffeae* est uniquement observée au printemps en automne au domaine Graoua et au printemps au domaine Benkebboura. Le genre *Tylenchorhynchus* est absent durant l'été dans ces mêmes domaines et en automne à Arsat Moulay Abdesslam. Cependant, il est présent au printemps et en automne dans les domaines de Graoua et Benkebboura, ainsi qu'au printemps et en été à Arsat Moulay Abdesslam. En ce qui concerne le genre *Meloidogyne spp*, il est présent dans tous les sites et pendant toutes les saisons, à l'exception de l'été au domaine Benkebboura. De même, certains NPP ne sont présents que pendant une seule saison et au niveau d'un site donné, c'est le cas par exemple de l'espèce *Hoplolaimus indicus* qui n'est rencontré que pendant le printemps exclusivement dans le Domaine Graoua.

Tableau 11. Inventaire taxonomique de la nématofaune phytoparasite des agrumes.

Taxon				Domaine Graoua			Domaine Benkebboura			Arsat Moulay Abdessalam		
Classe	Ordre	Famille	Genre/ espèce	Printemps	Eté	Automne	Printemps	Eté	Automne	Printemps	Eté	Automne
Chromadorea	*Tylenchida*	*Tylenchulidae*	*Tylenchulus semipenetrans*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Rhabditida	*Tylenchidae*	*Tylenchus* spp.	+	+	+	+	-	+	+	-	+
			Hoplolaimus indicus	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			Rotylenchus spp.	+	+	+	-	+	-	-	+	+
		Hoplolaimidae	*Pratylenchus spp.*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			Pratylenchus coffeae	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Secernentea			*Helicotylenchus spp.*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Tylenchida	*Tylenchulidae*	*Paratylenchus spp.*	+	+	+	+	+	-	+	+	+
		Belonolaimidae	*Tylenchorhynchus* spp.	+	-	+	+	-	+	+	+	-
		Heteroderidae	*Meloidogyne* spp.	+	+	+	+	-	+	+	+	+
		Heteroderidae	*Heterodera* spp.	+	-	-	+	-	-	-	-	+
		Hoplolaimidae	*Haplolaimus* spp.	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Tylenchoidea		*Anguinidae*	*Ditylenchus dipsaci*	+	+	+	+	-	+	+	-	+
			Xiphinema spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Enoplea	*Dorylaimida*	*Longidoridae*	*Xiphinema diversicaudatum*	+	+	-	+	+	-	+	-	-
			Xiphinema pachtainchum	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	Triplonchida	*Trichodoridae*	*Trichodorus* spp.	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Dorylaimea	*Dorylaimida*	*Longidoridae*	*Longidorus* spp.	+	+	-	-	-	-	-	-	+

+ : Présence de nématode
- : Absence de nématode

2. Variation de la densité, l'intensité d'infestation et la prévalence des NPP en fonction des saisons et des sites prospectés

Les résultats de la variation de la densité totale des NPP exprimée en nombre total de nématodes par 100g de sol et 10g de racines au niveau des domaine Graoua, Benkebboura et Arsat moulay Abdessalam sont représenté sur la **Figure 19**. Les analyses des données ont révélé une variation hautement significative de la densité totale des NPP dans les racines et le sol rhizosphérique des agrumes en fonction des saisons ($p < 0,0001$) et des sites ($p < 0,0001$) étudiés.

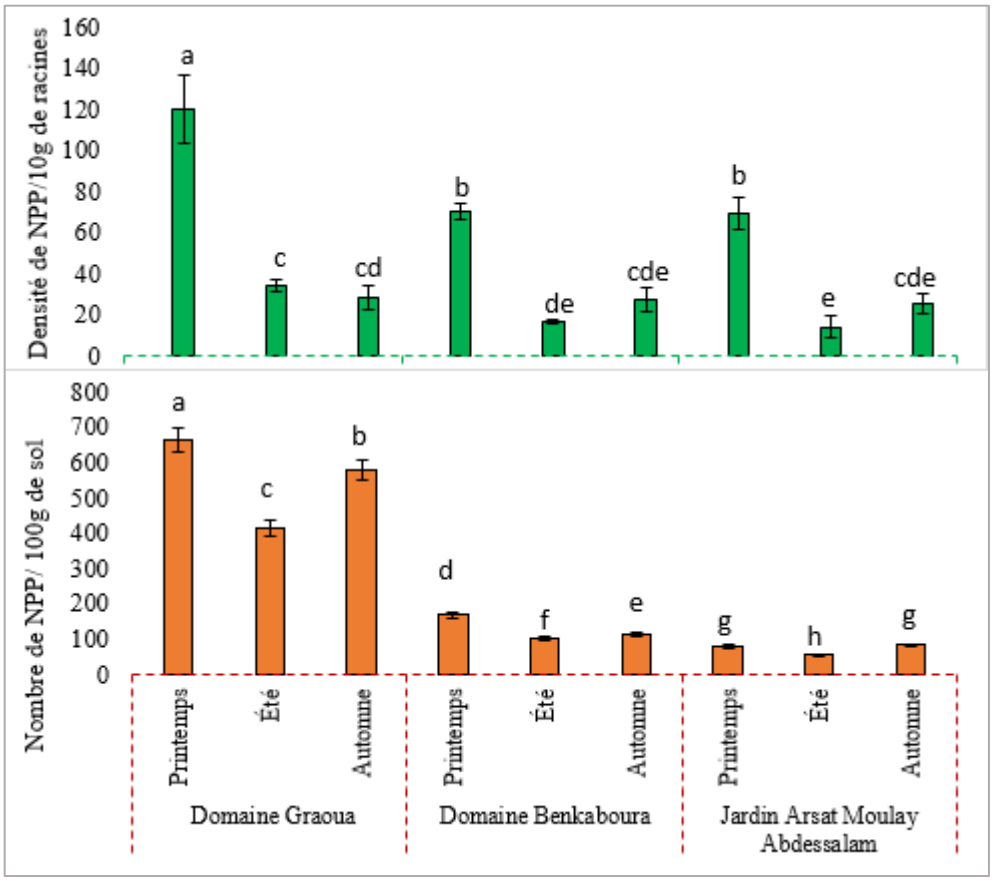


Figure 19. Variation de la densité des nématodes phytoparasites (NPP) au niveau des racines (10g) et de sol (100g) rhizosphérique des agrumes dans différents sites de la région de Marrakech en fonction des saisons. Les moyennes (± erreur standard) indiquées par des lettres différentes montrent une différence significative selon les tests à intervalles multiples de Tukey à $p < 0,05$.

Au niveau du sol rhizosphérique des agrumes, la densité des NPP la plus élevée a été observée au niveau du domaine Graoua pendant les trois saisons, avec un effectif total de 222 individus/100 g de sol au printemps, 213 individus/100 g de sol en automne et 154 individus/100 g de sol en été. Le domaine Benkebboura occupe le deuxième rang avec une

densité de 99 individus/100 g de sol au printemps et en été contre 63 individus/100 g de sol en automne. Alors que le nombre le plus faible de nématodes a été enregistré au niveau d'Arsat Moulay Abdeslam, avec 81 individus/100 g de sol recensés au printemps et en automne contre 43 individus/100 g de sol en été.

Au niveau des racines, la densité la plus élevée en NPP a été enregistrée au printemps au niveau du domaine Graoua (45 individus/10 g de racines), tandis que le nombre le plus faible en nématodes a été enregistré en été au niveau d'Arsat Moulay Abdeslam (8 individus/10 g de racines). Par ailleurs, la densité des NPP au niveau des racines n'a pas significativement varié au printemps entre le domaine Benkebboura et Arsat Moulay Abdeslam, ni pendant l'automne entre les trois sites.

D'autre part, nos résultats montrent que les variations saisonnières de la densité des NPP dépendent significativement de l'espèce et/ou genre de NPP et du site étudié. Globalement, l'espèce *T. semipenetrans* a enregistré la densité cumulée la plus élevée au niveau du domaine Graoua (398 nématodes/100g de sol et 53 nématodes/10g de racines), suivie du domaine Benkebbourra (99 nématodes/100g de sol et 12 nématodes/10g de racines) et de Arsat mly abdessalam (62 nématodes/100g de sol et 11 nématodes/10g de racines). De même, la densité de *T. semipenetrans* a été la plus élevée au printemps au niveau des trois stations, soit 157 nématodes/100g de sol et 21 nématodes/10g de racines recensés au domaine Graoua au printemps, contre 100 nématodes/100g de sol et 16 nématodes/10g de racines enregistré dans le même site en été et 141 nématodes/100g de sol et 16 nématodes/10g de racines en automne (**Tableaux 12 et 13**). Arsat Moulay Abdessalam a présenté les plus faibles densités de *T. semipenetrans* au cours des trois saisons, mais avec une densité plus élevée au printemps (23 nématodes/100g de sol et 2 nématodes/10g de racines) qu'en été (18 nématodes/100g de sol et 6 nématodes/10g de racines). Pendant l'été, seules deux NPP ont été détectées dans les racines des agrumes au niveau d'Arsat Moulay Abdessalam, à savoir *T. semipenetrans* (6 nématodes/10g de racines) et *Trichodorus* spp. (2 nématodes/10g de racines).

En automne, la densité la plus élevée a été enregistrée chez *T. semipenetrans* au niveau du domaine Graoua (141 nématodes/100g de sol et 16 nématodes/10g de racines), suivi du domaine Benkebboura (44 nématodes/100g de sol et 3 nématodes/10g de racines) et d'Arsat Moulay Abdessalam (21 nématodes/100g de sol et 5 nématodes/10g de racines). Les genres *Helicotylenchus* et *Pratylenchu* ont occupé le 2ème rang (11 nématodes/100g de sol et 7 nématodes/10g de racines) au niveau du domaine Graoua, suivi du genre *Tylenchus* (15

nématodes/100g de sol et 0 nématodes/10g de racines) et de *Xiphinema* (7 nématodes/100g de sol et 2 nématodes/10g de racines).

Tableau 12. Densité des nématodes phytoparasites au niveau du sol (100 g) des agrumes dans différents sites de la région de Marrakech pendant les saisons de printemps, d'été et d'automne.

	Densité								
	Domaine Graoua			Domaine Benkebboura			Arsat Moulay Abdessalam		
	Printemps	Eté	Automne	Printemps	Eté	Automne	Printemps	Eté	Automne
Tylenchulus semipenetrans	157	100	141	36	19	44	23	18	21
Pratylenchus spp.	14	8	11	1	5	-	3	1	1
Pratylenchus coffeae	3	4	-	-	3	-	3	-	-
Paratylenchus spp.	2	4	4	1	-	-	6	-	3
Helicotylenchus spp.	11	9	11	5	-	5	3	3	3
Tylenchus spp.	4	4	15	5	-	2	3	-	3
Xiphinema spp.	2	3	7	1	-	-	-	4	-
Xiphinema diversicaudatum	-	-	3	3	-	-	-	-	-
Xiphinema pachtainchum	-	-	2	-	-	-	-	-	-
Hoplolaimus indicus	4	-	-	4	-	-	-	-	-
Rotylenchus spp.	4	5	4	2	-	-	3	-	1
Tylenchorhynchus spp.	5	4	-	6	-	2	1	9	-
Meloidogyne spp.	7	6	3	3	-	6	1	6	1
Trichodorus spp.	5	3	2	1	-	3	-	2	1
Longidorus spp.	1	2	4	-	-	1	-	-	-
Heterodera spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ditylenchus dipsaci	3	2	2	3	1	-	-	-	1
Haplolaimus spp.	-	-	4	-	-	-	-	-	-

- : Absence de nématodes

Tableau 13. Densité des nématodes phytoparasites au niveau de racines (10g) des agrumes dans différents sites de la région de Marrakech pendant les saisons de printemps, d'été et d'automne.

	Densité								
	Domaine Graoua			Domaine Benkebboura			Arsat Moulay Abdessalam		
	Printemps	Eté	Automne	Printemps	Eté	Automne	Printemps	Eté	Automne
Tylenchulus semipenetrans	21	16	16	8	1	3	2	6	5
Pratylenchus spp.	7	7	7	2	2	-	2	-	2
Pratylenchus coffeae	-	-	-	5	-	-	3	-	-
Paratylenchus spp.	3	2	2	9	-	-	5	-	3

Helicotylenchus spp.	-	-	7	-	-	-	2	-	-
Tylenchus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xiphinema spp.	4	-	2	-	5	3	3	-	3
Xiphinema diversicaudatum	5	-	-	-	2	-	3	-	3
Xiphinema pachtainchum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoplolaimus indicus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rotylenchus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tylenchorhynchus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meloidogyne spp.	-	-	2	-	-	1	-	-	3
Trichodorus spp.	3	-	2	9	-	1	-	2	-
Longidorus spp.	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Heterodera spp.	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Ditylenchus dipsaci	-	-	-	-	-	-	3	-	-
Haplolaimus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : Absence de nématode

En ce qui concerne l'intensité d'infestation du sol rhizosphérique et des racines, elle a varié entre les saisons, les sites et les espèces de NPP. Le printemps a enregistré les valeurs de l'intensité d'infestation des sols et des racines les plus élevées chez la plupart des NPP et au niveau de tous les sites étudiés. L'espèce *T. semipenetrans* a présenté l'intensité d'infestation la plus élevée au niveau du sol du domaine Graoua indépendamment du site et de la saison, soit 52 nématodes/100g de sol au printemps, 41,3 nématodes/100g de sol en été et 39,9 nématodes/100g de sol en automne **(Tableau 14)**. Arsat Moulay Abdessalam a enregistré l'intensité d'infestation par *T. semipenetrans* la moins élevée quelque soit la saison avec 2,8 ; 8 et 16,8 nématodes/100g de sol respectivement au printemps, en été et en automne. De même, l'infestation des racines par *T. semipenetrans* a été plus élevée en été au domaine Graoua avec 12 nématodes/10 g de racines, comparé aux autres saisons et aux autres sites **(Tableau 15)**. Tandis qu'au printemps au niveau d'Arsat Moulay Abdessalam, le genre *Paratylenchus* a présenté l'intensité la plus élevée dans le sol et racines avec 4 nématodes/100g de sol et 12 nématodes/10g de racines.

En été, *T. semipenetrans* a présenté la plus forte intensité au niveau des trois sites étudiés, atteignant respectivement 41,30 nématodes/100 g de sol et 12 nématodes/ 10 g de racines au domaine Graoua, 10 nématodes/100 g de sol et 1 nématodes /10 g de racines au domaine Benkebboura et 8 nématodes/100 g de sol et 6 nématodes /10 g de racines à Arsat Moulay Abdessalam (**Tableaux 14 et 15**).

Tableau 14. Intensité des NPP au niveau du sol rhizosphérique (100 g) des agrumes dans différents sites de la région de Marrakech pendant les saisons de printemps, d'été et d'automne.

	Intensité								
	Domaine Graoua			Domaine Benkebboura			Arsat Moulay Abdessalam		
	Printemps	Eté	Automne	Printemps	Eté	Automne	Printemps	Eté	Automne
Tylenchulus semipenetrans	52	41,30	39,91	36	10	28	2,8	8	16,8
Pratylenchus spp.	2	6,25	1,89	0,33	4	-	1,33	1	1
Pratylenchus coffeae	2,50	-	2,33		3	-	2,5	-	-
Paratylenchus spp.	2,33	1,67	1,67	1	-	-	4	-	2
Helicotylenchus spp.	6,75	7	2,60	3,5	-	3,5	1,33	2	2
Tylenchus spp.	4	11	4	5	-	2	3	-	3,5
Xiphinema spp.	1	5,33	1,09	1	-	-	-	4	-
Xiphinema diversicaudatum	-	3	-	1		-	-	-	-
Xiphinema pachtainchum	4	2	5	-	1	-	-	-	-
Hoplolaimus indicus	4	-	3,50	2	-	-	-	-	-
Rotylenchus spp.	3	3	3	6	-	-	3	-	1
Tylenchorhynchus spp.	5,5	-	1,50	3	-	-	1	5,67	-
Meloidogyne spp.	1	3	0,50	1	-	6	1	5	1
Trichodorus spp.	1	2	-	-	-	1,5	-	1	1
Longidorus spp.	-	3,33		-	-	-	-	-	-
Heterodera spp.	-	-		-	-	-	-	-	-
Ditylenchus dipsaci	3,57	2	1,67	1,5	1	-	-	-	1
Haplolaimus spp.		3	2			-	-	-	-

- : Absence de nématodes

Tableau 15. Intensité des NPP au niveau de racines (10g) des agrumes dans différents sites de la région de Marrakech pendant les saisons de printemps, d'été et d'automne.

	Intensité								
	Domaine Graoua			Domaine Benkebboura			Arsat Moulay Abdessalam		
	Printemps	Eté	Automne	Printemps	Eté	Automne	Printemps	Eté	Automne
Tylenchulus semipenetrans	5	12	7	7	1	3	3	6	4
Pratylenchus spp.	3,4	4	7	2	5	-	2	-	2
Pratylenchus coffeae	-	-	-	5	-	-	5	-	-
Paratylenchus spp.	5	2	2	2	-	-	12	-	1
Helicotylenchus spp.	-	-	5	-	-	-	2	-	-
Tylenchus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xiphinema spp.	2	-	2	-	5	2	3	-	1
Xiphinema diversicaudatum	4	-	-	-	2	-	3	-	1
Xiphinema pachtainchum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoplolaimus indicus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rotylenchus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tylenchorhynchus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meloidogyne spp.	-	-	3		-	1	-	-	2

Trichodorus spp.	5	-	2	4	-	1	-	3	-
Longidorus spp.	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Heterodera spp.	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Ditylenchus dipsaci	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Haplolaimus spp.	-	-	-	-	-	-	3	-	-

- : Absence de nématodes

En termes de prévalence, il est observé que globalement, les NPP sont moins prévalent en été au niveau des trois sites. Cependant, leur prévalence est plus élevée au printemps qu'en automne au niveau des domaines Graoua et Benkebboura, alors qu'elle enregistre des valeurs plus faibles à Arsat moulay abdessalam (**Tableau 16**).

Au cours de la saison printanière, l'espèce *T. semipenetrans* a été la plus prévalente dans les domaines Benkebboura (100%) et Graoua (70,83%), suivi de genre *Pratylenchus* avec une prévalence de 70% dans le domaine Benkebboura et 50% dans le domaine Graoua (Tableau 17). Toujours au printemps et en termes de prévalence, le genre *Xiphinema* a occupé le troisième rang dans le domaine Graoua (45,83%) tandis que l'espèce *Pratylenchus coffeae* a été classée la troisième dans le domaine Benkebboura (50%). Cependant, au niveau d'Arsat Moulay Abdeslam, le genre *Paratylenchus* a été le plus fréquent (50%), suivi des espèces *Pratylenchus coffeae* (40%) et *T. semipenetrans* (25,83%).

Pendant la saison estivale, *T. semipenetrans* et *Pratylenchus* spp demeurent les NPP les plus prévalent au niveau des domaines Graoua et Benkebboura. En effet, l'espèce *T. semipenetrans* a présenté une prévalence de 60% dans le domaine Benkebboura et de 45% dans le domaine Graoua, tandis que le genre *Pratylenchus* a affiché une prévalence de 45,83% et 45% respectivement dans les domaines Graoua et Benkebboura. Par ailleurs, au niveau d'Arsta Moulay Abdessalam, les genres *Tylenchorhynchus* (30%) et *Trichodorus* (30%) sont les plus prévalent durant l'été, suivis de *Meloidogyne* avec une prévalence de 20%.

Au cours de la saison d'automne, l'espèce *T. semipenetrans* et les genres *Xiphinema, Pratylenchus* et *Helicotylenchus* sont les plus fréquent dans les domaines Graoua et Benkebboura. En effet, *T. semipenetrans* présente une prévalence de 83,33% et 58,33% respectivement au niveau de domaines de Bekaboura et Graoua. Le genre *Xiphinema* a affiché une prévalence de 33,33% et 45,83% respectivement dans les mêmes domaines. Quant au genre *Helicotylenchus*, sa prévalence est de 33,33% et 20,83% respectivement dans les domaines de Bekaboura et Graoua. À Arsat Moulay Abdessalam, les NPP les plus prévalent sont *Paratylenchus* (40%), *T. semipenetrans* (30%) et *Pratylenchus* (20%).

Tableau 16. Prévalence (Pr) des nématodes phytoparasites des agrumes dans différents sites de la région de Marrakech pendant les saisons de printemps, d'été et d'automne.

	Prévalence (%)								
	Domaine Graoua			Domaine Benkebboura			Arsat Moulay Abdessalam		
	Printemps	Eté	Automne	Printemps	Eté	Automne	Printemps	Eté	Automne
Tylenchulus semipenetrans	70,83	45	58,33	100	60	83,33	25,83	14,29	30
Pratylenchus spp.	50	45,83	37,5	70	45	29,16	10,71	3,57	20
Pratylenchus coffeae	8,33	-	12,5	50	-	-	40	-	-
Paratylenchus spp.	29,17	12,5	12,5	25	3,57	16,67	50	-	40
Helicotylenchus spp.	16,67	8,33	20,83	7,14	-	33,33	10,71	10,71	20
Tylenchus spp.	4,17	8,33	4,17	7 ,14	-	16,67	7,14	-	20
Xiphinema spp.	45,83	25	45,83	25	7,14	33,33	10,71	10	10
Xiphinema diversicaudatum	8,33	4,17	-	25	3,57	-	3,57	-	10
Xiphinema pachtainchum	4,17	4,17	-	-	25	-	-	-	-
Hoplolaimus indicus	4,17	-	-	25	-	-	10	-	-
Rotylenchus spp.	12,5	8,33	4,17	3,57	-	-	3,57	-	10
Tylenchorhynchus spp.	16,67	-	8,33	3,57	-	16,67	7,14	30	-
Meloidogyne spp.	20,83	8,33	12,5	75	-	16,67	-	20	10
Trichodorus spp.	4,17	4,17	16,67		-	33,33	-	30	7
Longidorus spp.	12,5		16,67	3,57	-	16,67	-	-	-
Heterodera spp.	3,57	12,5	-	7,14	-	-	3,57	-	10
Ditylenchus dipsaci	3,58	4,17	12,5	7,14	-	-	3,57	-	10
Haplolaimus spp.	-	8,33	8,33	-	-	-	-	-	-

- : Absence de nématodes

3. Variation des paramètres physicochimiques des sols étudiés en fonction des saisons et des sites

Les données relatives à l'analyse des paramètres physico-chimiques du sol des différents sites prospectés et pendant les différentes saisons étudiées sont présentées dans le **Tableau 17**. Les différents paramètres physico-chimiques évalués, la conductivité électrique ($p < 0,05$), le taux d'humidité ($p < 0,05$), ainsi que les teneurs en carbone organique ($p < 0,001$), matière organique ($p < 0,001$), phosphore total ($p < 0,001$), phosphore assimilable ($p < 0,001$), azote ($p < 0,03$), Na ($p < 0,05$) et K ($p < 0,001$) ont présenté des variations significatives en fonction des sites et des saisons. En revanche, la teneur en Ca et en $CaCO_3$ ($p > 0,05$) n'ont pas significativement varié entre les saisons et les sites étudiés.

La conductivité électrique (CE) a été plus élevée en automne et plus faible en été au niveau des trois sites étudiés. En effet, la CE a été 3,13 ; 1,9 et 1,3 fois plus élévée en automne qu'en été respectivement au niveau du domaine Benkebboura et Arsat Moulay Abdessalam et au domaine Graoua. La valeur la plus élevée de la CE a été observée au niveau du domaine

Benkebboura durant l'automne (784,67µs/cm), soit environ 3,16 fois supérieure à la valeur minimale (248,25 µs/cm) observée au niveau d'Arsat Moulay Abdeslam pendant l'été (**Tableau 17**).

Le pH a été plus élevé au printemps au niveau du domaine Graoua (7,85) et à Arsat moulay Abdessalam (8,27), alors qu'il n'a pas significativement varié entre l'été et l'automne au niveau trois sites étudiés. Les valeurs du pH du sol ont fluctué de 7,15, observé en été au domaine Benkebboura, à 8,27, noté au printemps à Arsat Moulay Abdeslam. Ces données indiquent une nature de sol allant de légèrement alcaline (pH 7,15) à alcaline (pH 8,27) durant les trois saisons étudiées, et ce dans l'ensemble des régions examinées (**Tableau 17**).

Le taux d'humidité maximal a été observé au niveau du domaine Graoua au printemps, avec une valeur de 44,51%, tandis que le taux minimal a été observé au niveau d'Arsat Moulay Abdessalam pendant la saison d'été, avec une valeur de 12,47%. Aucune variation significative du taux d'humidité n'a été observée entre les saisons de printemps et d'automne pour l'ensemble des sites étudiés ($p > 0,05$) (**Tableau 17**).

La teneur en carbone organique (CO) des sols a enregistré les valeurs les plus élevée en automne et les valeurs les plus faible au printemps, mais ces valeurs ont été respectivement similaires dans les trois sites. En effet, en automne, la CO a été au moins 3 fois et 1,5 fois plus élevée que celle enregistrée respectivement au printemps et en été au niveau de tous les sites (**Tableau 17**).

Concernant la matière organique (MO) du sol, sa teneur a été plus élevée en automne qu'en été et qu'au printemps quelque soit le site étudié. Ainsi, la teneur automnale en MO a été 14,2 fois, 3,25 fois et 2,94 fois plus élevée que celle printanière respectivement à Arsat Moulay Abdessalem, au domaine Graoua et au domaine Benkebboura. La teneur la plus élevée en matière organique (1,99%) a été observée au niveau d'Arsat Moulay Abdessalam, suivi du domaine Benkebboura (0,47%) et Graoua (0,39%) en automne, contre respectivement (0,14%, 0,16% et 0,12% pendant la saison printanière (**Tableau 17**).

La teneur en Azote a enregistré les valeurs les plus élevées en été et les valeurs les plus faibles au printemps au niveau des trois sites d'étude. La teneur la plus élevée en azote (10, 94%) a été enregistrée au niveau de domaine Graoua pendant la saison estivale, soit environ 3,25 fois plus que la teneur mesurée dans le même site au printemps et 3,5 fois plus que le taux d'azote le plus faible noté au niveau d'Arsat Moulay Abdeslam au printemps (**Tableau 17**).

Les teneurs des autres éléments minéraux (phosphore total, phosphore assimilable, sodium, et potassium) ont été nettement plus élevées au printemps et globalement moins élevée en été. Les teneurs les plus élevées en phosphore total et assimilable ont été observées au niveau du domaine Benkebboura au printemps, avec des valeurs respectives de 115,38 mg/g et 68,81 mg/g. En revanche, les teneurs les plus faibles en phosphore total (27,97 mg/g) et en phosphore assimilable (11,38 mg/g) ont été observées à Arsat Moulay Abdessalam en automne et en été respectivement (**Tableau 17**). De même, la teneur maximale en Na+ (592,67mg/g) a été observée au niveau du domaine Benkebboura au printemps, soit 2,4 fois supérieure à la teneur minimale en Na+ (226,27mg/g), enregistrée au niveau d'Arsat Moulay Abdeslam en été (**Tableau 17**).

En ce qui concerne la teneur en potassium, la teneur la plus élevée (142,37 mg/g) a été observée au domaine Graoua au printemps contre 120,27 mg/g enregistrée dans le même site en automne. En revanche, la teneur la plus faible en K (79,16 mg/g) a été observée à Arsat Moulay Abdessalam au printemps. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée dans les teneurs en calcium et en calcaire entre les différentes saisons étudiées au niveau des différents sites ($p > 0,05$) (**Tableau 17**).

La texture du sol est similaire dans les trois sites étudiés, il s'agit d'un sol sablo-limoneux (**Tableau 17**).

Tableau 17.Variation des propriétés physicochimiques des sols rhizosphériques des agrumes des différents sites prospectés en fonction des saisons.

	Domaine Graoua			**Domaine Benkebboura**			**Arsat Moulay Abdeslam**		
	Printemps	Eté	Automne	Printemps	Eté	Automne	Printemps	Eté	Automne
Conductivité (µs/cm)	340,85±3,74^{d}	391,63± 1,54 ^{cd}	512,06±7,28 ^{b}	732,33±0,5^{a}	417,67±8,76 ^{cd}	784,67±7,09^{a}	707,62±5,34^{ab}	248,25± 1,23^{d}	777,88±0,08^{a}
pH	7,85± 0,1^{a}	7,31± 0,9^{b}	7,52± 0,35^{b}	7,61± 0,45^{b}	7,15± 3,86^{b}	7,51± 0,35^{b}	8,27± 0,45^{a}	7,49± 0,60^{b}	7,68± 0,76^{b}
Humidité (%)	44,51±7,42^{a}	19,95±2,02^{c}	44,2±11,56^{a}	19,9±0,19^{c}	12,95±0,46^{d}	23,03±2,26^{c}	32,77±0,93^{b}	12,47±1,17^{d}	33,81±4,19^{b}
Calcaire (%)	26,17±8,78^{a}	22,87±11,28^{a}	22,56±8,70^{a}	21,52±8,53^{a}	17,85±3,77^{a}	17,12±3,77^{a}	30,53±4,84^{a}	29,21±11,21^{a}	29,96±11,41^{a}
C. Organique (%)	0,07±0,01^{c}	0,16±0,02^{b}	0,22±0,03^{a}	0,09±0,02^{c}	0,17±0,02^{b}	0,26±0 ,01^{a}	0,08±0,01^{c}	0,16±0,01^{b}	0,27±0,01^{a}
M. Organique (%)	0,12±0,02^{b}	0,28±0,01^{b}	0,39±0,04^{b}	0,16±0,07^{b}	0,25±0,03^{b}	0,47±0,05^{b}	0,14±0,09^{b}	0,32±0,01^{b}	1,99± 1,12^{a}
Azote (%)	4,48±0,13^{c}	10, 94±0,43^{a}	4,71±3,21^{c}	4,43±0,18^{c}	6,49±1,43^{b}	5,72±0,12^{bc}	3, 12±1,25^{c}	5,22±0,06^{bc}	4,96±0,12^{c}
P. Total (mg/g)	108,91± 6,33^{a}	60,99±8,76^{c}	41,29 ±3,20^{b}	115,38± 4,90^{a}	66,20±8,32 ^{b}	48,58 ±5,55^{b}	96,15 ±3,12^{b}	40,11 ±7,65^{b}	27,97±7,47^{c}
P. Assimilable (mg/g)	52,79± 6,31^{ab}	19,09±5,91^{d}	23,03±6,16^{c}	68,81±13,10^{a}	18,46±6,79^{d}	39,91±2,51^{bc}	57,69±9,76^{ab}	11,38±1,43^{d}	23,91±8,78^{c}
Sodium (g/kg)	475,93±14,27^{ab}	234,14±9,76^{c}	372,97±12,36^{bc}	592,67±11,52^{a}	276,42±9,45^{bc}	326,28± 6,02^{bc}	465,36±8,14^{ab}	226,27±16,21^{c}	358,53±6,87^{bc}
Potassium (g/kg)	142,37 ±7,84^{ab}	129,91 ±7,47^{ab}	120,27 ±8,70^{ab}	173,61 ±10,55^{a}	103,25 ±3,73^{b}	130,25±2,42^{ab}	79,16 ±5,46^{c}	98,69 ±5,78^{bc}	90,82 ±8,50^{bc}
Calcium (g/kg)	308,76±11,89^{a}	292,20±2,45^{a}	318,34±12,79^{a}	320,65±1,70^{a}	324,87±1,42^{a}	333,78±1,93^{a}	324,09±1,93^{a}	312,43±10,89^{a}	326,93±4,89^{a}
Texture		sablo-limoneux			sablo-limoneux			sablo-limoneux	

Les moyennes suivies par des lettres différentes, dans la même ligne sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

4. Corrélation entre les paramètres physicochimiques du sol, les saisons, et les paramètres nématologiques

Les résultats des analyses de corrélation entre les paramètres physico-chimiques du sol, les saisons, et les paramètres nématologiques des différents sites étudiés sont présentés dans la **Figure 20**. Les résultats obtenus démontrent que la densité des nématodes phytoparasites et négativement corrélée à la teneur en matière organique (r=-0,42), en carbone organique (=-0,32) et en azote (=-0,30) alors qu'elle est positivement corrélée au pH (r=0,004), à l'humidité (r=0,59), et aux teneurs en sodium (r=0,10), en calcium (r=0,09) et en potassium (r=0,38). Concernant les saisons, la densité des nématodes phytoparasites est positivement corrélé avec le printemps (r=0,96), l'automne (r=0,92) et négativement avec corrélé avec l'été (r=-0,64).

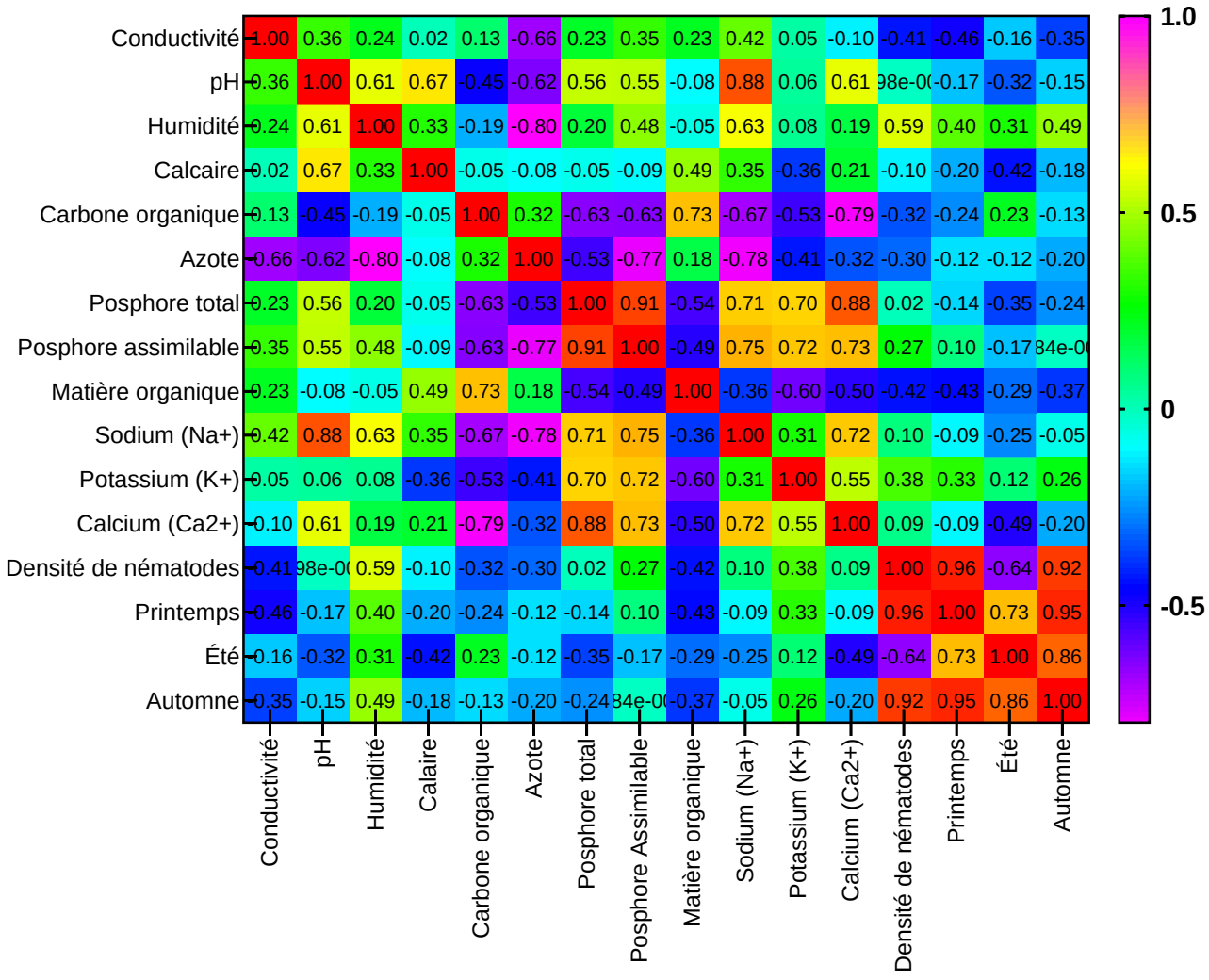


Figure 20. Matrice de corrélation entre les paramètres physico-chimiques du sol, les saisons, les pratiques agricoles (porte-greffes) et paramètres nématologiques des trois sites durant les trois saisons (Printemps, Eté, Automne). Coefficients de corrélation de Pearson sont indiqués par des couleurs et aussi par chiffres pour faciliter l'interprétation.

Les résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) présentés dans la **Figure 21** montrent que le carbone organique (COT) et la matière organique (MO) constituent le groupe le plus négativement corrélé avec le printemps et avec la densité des nématodes phytoparasites des agrumes (DN). La teneur en éléments minéraux, l'humidité et le pH du sol sont positivement corrélés avec le printemps et constituent le groupe le plus positivement corrélé à la densité des NPP.

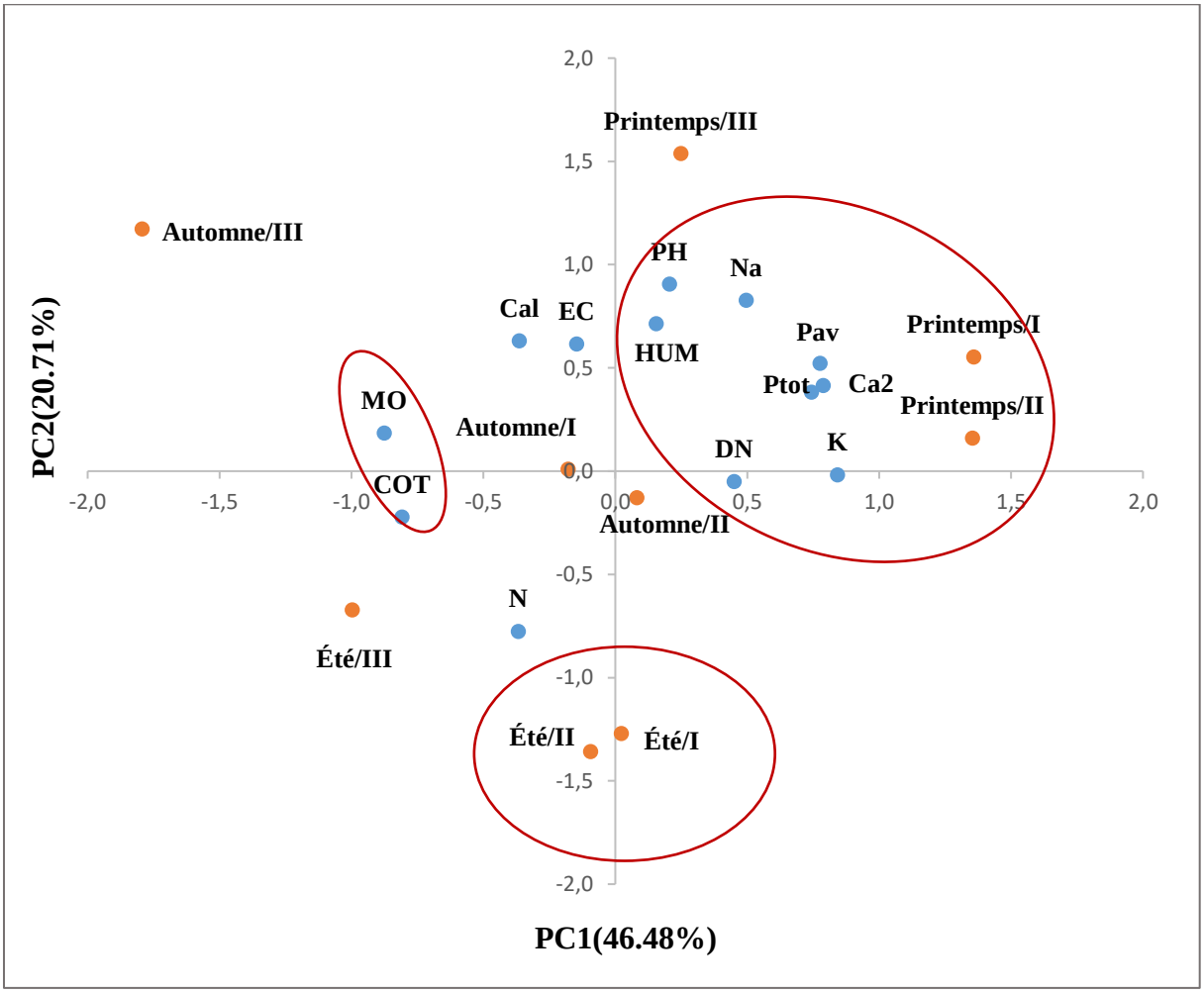


Figure 21. Corrélations statistiques par analyse en composantes principales (ACP) des paramètres physicochimiques et nématologiques des sols des trois sites (**I** : Domaine Graoua ; **II** : Domaine Benkebboura ; **III** : Arsat Moulay Abdeslam), durant les trois saisons d'études.

IV. DISCUSSION

Pour mieux comprendre la dynamique saisonnière des populations de NPP associés aux agrumes, des prospections saisonnières ont été menées dans les différents sites prospectés au niveau de la région de Marrakech, domaine agricole Graoua, domaine agricole Benkebboura et Arsat Moulay Abdessalam. Les résultats obtenus ont montré que globalement la saison

printanière a été la plus favorable au développement des NPP, suivie de l'automne, tandis que la saison d'été a été la moins propice au développement de ces nématodes. Néanmoins, la dynamique des populations des NPP en fonction des saisons a significativement variée avec les espèces de NPP. Tenant compte de sa densité dans le sol rhizosphérique et dans les racines, le nématode des agrumes *T. semipenetrans* a été le plus prévalent quelque soit la saison et le site étudié. En effet, ce nématode représente à lui seul plus de 66% des NPP totaux dans le sol du domaines Graoua, plus de 51% au domaine Benkebboura et plus de 50 % à Arsat Moulay Abdessalam quelque soit la saison. En plus, *T. semipenetrans* a enregsitré les prévalences maximales, soit 100% au printemps, 83% en automne, et 60% en été. Ces résultats suggèrent que les populations de NPP sont fortement influencées par la succession de saisons, enregistrant les effectifs les plus élevés au printemps et en automne. En effet, selon plusieurs études (Sorribas *et al*., 2000; Saeed *et al*., 2019; Abokorah and Elsebaay, 2022) la densité des populations des NPP des agrumes suit une évolution bimodale avec deux pics, l'un au printemps et l'autre en automne, probablement en réponse au développement de nouvelles racines fibreuses sur lesquelles les nématodes se développent et se nourrissent. Cependant, selon Duncan and Eissenstat (1993) la disponibilité de nouvelles racines fibreuses n'est pas suffisante à elle seule pour expliquer la variation de la densité des NPP. En effet, ces auteurs ont constaté un déclin de la population de nématodes en été, alors que la biomasse racinaire des agrumes a augmenté de 75 % pendant cette période. La diminution des niveaux d'amidon dans les cellules nourricières infestées par les nématodes par rapport aux cellules corticales adjacentes indique que l'amidon peut servir de source de nutriments pour les nématodes phytoparasites des agrumes (Cohn, 1965). En effet, les travaux de Duncan and Eissenstat, (1993) ont rapporté que la teneur des racines en hydrates de carbone est l'un des facteurs principaux déterminant la dynamique des NPP, comme démontré par la faible densité de ces nématodes en été coïncidant avec un contenu en carbohydrates des racines relativement faible en cette saison. D'autre part, la température et l'humidité du sol sont également des facteurs clés affectant la dynamique saisonnière des populations de nématodes phytoparasites (Verschoor, 2002 ; Nisa *et al*., 2021). Ces facteurs peuvent influencer directement la survie, la reproduction et l'activité des nématodes. Plusieurs études, notamment celle de Verschoor (2002) et Nisa *et al*., (2021), ont affirmé que l'abondance et la structure des populations de nématodes changent en fonction de la température et l'humidité du sol qui elles même varient avec la saison. En été, l'augmentation de la température du sol peut entraîner des conditions de sécheresse, ce qui peut entraîner une baisse de la population de nématodes dans les couches supérieures du sol due à leur migration

en profondeur à la recherche de l'humidité. En revanche, en automne et au printemps, la combinaison d'une température et d'une humidité du sol adéquates peut être responsable de la ré-augmentation de la population de nématodes dans les couches supérieures du sol.

Parmi les trois sites étudiés, le domaine Graoua est celui qui présente la plus forte infestation de nématodes (663 individus/100g de sol au printemps, 579 individus/100g de sol en automne et 414 individus/100g de sol en été), suivi du domaine Benkebboura (170 individus/100g de sol au printemps, 100 individus/100g de sol en été et 116 individus/100g de sol en automne), tandis que le jardin Arsat Moulay Abdeslam est le site le moins infesté (80 individus/100g de sol au printemps, 56 individus/100g de sol en été et 80 individus/100g de sol en automne). Cette différence du degré d'infestation entre les trois sites peut être attribuée aux pratiques agricoles adoptées dans chaque site. En effet, le domaine Graoua est équipé de système moderne permettant le pilotage de l'irrigation et la fertilisation assurant de meilleures conditions en eau et fertilisants pour les cultures en place. Le domaine Benkeboura utilisent également le système de goutte à goutte qui sert en même temps pour fertiliser les cultures mais le pilotage reste manuel et moins perfectionné qu'au domaine Graoua. Par ailleurs, à Arsat moulay Abdessalam l'irrigation reste conventionnelle, il n'y a pas de programme de fertilisation sinon par addition de fumure organique. Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux de Liu *et al*. (2016), qui ont également observé une augmentation de la densité des nématodes dans les cultures de riz et de blé fertilisées par rapport aux témoins non fertilisés, avec une variation allant de 15% à 90%. Cette augmentation peut être expliquée par l'effet bénéfique des engrais sur la croissance des cultures, ce qui entraîne une augmentation de la quantité de rhizodépôts ou de résidus qui servent de substrats pour les micro-organismes et les nématodes. Toutefois, l'ajout d'azote dans le sol peut également favoriser l'infestation par certaines espèces de nématodes, telles que *Pratylenchus brachyurus* et *Tylenchorhynchus martini*, comme l'ont observé Traoré *et al*. (2012). Cependant, l'ajout de la matière organique au sol peut avoir des effets bénéfiques en réduisant la densité et la survie des nématodes (Verdejo-Lucas and McKenry, 2004), ce qui pourrait expliquer le faible taux d'infestation dans le jardin Arsat Moulay Abdeslam, où le taux de matière organique est le plus élevé (1.99%). En effet, la décomposition de la matière organique peut libérer des produits toxiques pour les nématodes ou stimuler la croissance des champignons qui sont leurs ennemis naturels (Moosavi, 2022; Jabbar and Abedulridah, 2023).

L'utilisation de cultures associées peut également être une pratique efficace pour réduire les populations de NPP. Les cultures associées peuvent fournir un habitat pour les prédateurs

de nématodes, tels que les acariens, qui peuvent réduire les populations de nématodes phytoparasites en les utilisant comme source de nourriture (Krueger and McSorley, 2008). En effet, les acariens exploitent les produits chimiques émis par les nématodes, tels que le dioxyde de carbone, pour localiser leurs hôtes (Banerjee and Hallem, 2020). Après avoir détecté un nématode, ils sont capables de l'attaquer et de s'en nourrir (Krueger and McSorley, 2008) . Elles peuvent également produire des exsudats racinaires qui sont toxiques pour de nombreux types de nématodes phytoparasites, tels que le nématode des lésions radiculaires (*Pratylenchus* spp.) et le nématode à galles (*Meloidogyne* spp.) (Li *et al*. 2018). Cette stratégie a été mise en œuvre avec succès dans le domaine Benkebboura, où l'utilisation de l'oignon comme culture de couverture a permis de réduire considérablement la densité des NPP. Les racines d'oignon libèrent des exsudats favorisant la prolifération de micro-organismes utiles tels que les champignons mycorhiziens et les bactéries PGPR, qui peuvent contribuer à la réduction des populations de nématodes (Zhou *et al*., 2011; Vives-Peris *et al*., 2020). L'effet bénéfique de l'utilisation de l'oignon comme culture de couverture pour réduire les nématodes a également été démontré chez d'autres cultures, telles que la betterave à sucre. En effet, Abdel-Baset, (2020) a montré que l'intercalage d'oignon avec la betterave à sucre a permis de réduire les populations de nématodes à galles dans les racines de la betterave. Ces chercheurs ont identifié le 4-hydroxy-benzèneéthanol comme un composant majeur des exsudats racinaires de l'oignon qui inhibe l'activité des juvéniles et diminue la capacité d'éclosion des œufs des nématodes à galles des racines. Le 4-hydroxy-benzèneéthanol a été confirmé comme un nématicide naturel efficace (Ali and Saifullah, 2019).

Les différences de la résistance des porte greffes utilisés au niveau de chaque site pourrait également être avancée comme élément explicatif de la différence de la distribution des NPP et leur dynamique en fonction des saisons. En effet, l'utilisation des porte-greffes résistants constitue aussi une stratégie importante pour la gestion de NPP. Des études récentes (Duncan *et al*.1994;Verdejo-Lucas and Kaplan ,2002) ont montré que les porte-greffes résistants aux nématodes, tels que les hybrides de *P. trifoliata* comme le *Citrange Carrizo* (Washington' x Poncirus trifoliata), crée une barrière physique et/ou une réaction de défense chimique qui limite l'infection et la reproduction des nématodes. Cela confère une bonne résistance ou tolérance au nématode des agrumes *T. semipenetrans*. D'autres études (Castillo *et al*., 2017; Abd-Elgawad, 2020; Bowman and Joubert, 2020) ont indiqué que les porte-greffes Cléopâtre et Bigaradier (*Citrus aurantium*) sont sensibles. Cependant, le *Citrus aurantium* est largement utilisé comme porte-greffe pour les agrumes amers tels que les oranges amères et les

citrons, en raison de sa tolérance aux conditions de sol variées et de sa compatibilité satisfaisante avec les grandes variétés commerciales, ce qui permet une production abondante de fruits de qualité (Castle *et al*., 2016).

V. CONCLUSION

Dans cette partie de notre étude, nous avons évalué la diversité des populations de NPP au niveau du sol rhizosphérique et des racines des agrumes au niveau de trois vergers agrumicoles de la région de Marrakech, Domaine agricole Graoua, Domaine Benkebboura et Arsta moulay Abdessalam, en fonction des fluctuations saisonnières, des pratiques agricoles (fertilisation, présence ou absence de cultures associées) et des caractéristiques physicochimiques du sol. Nous avons recensé onze genres et sept espèces de nématodes phytoparasites dans les différents sites étudiés. Les résultats montrent qu'en général, les NPP sont plus abondants au printemps au niveau du domaine Graoua, suivi par le domaine Benkebboura et d'Arsat Moulay Abdeslam. *T. semipenetrans*, *Helicotylenchus* spp. et *Xiphinema* spp. ont été rencontrés dans les trois sites et pendant toutes les saisons. *T. semipenetrans* a été le plus abondant, en particulier au printemps. L'analyse des corrélations entre les paramètres physicochimiques et phytonématologiques montre une étroite relation entre la dynamique des nématodes et les propriétés du sol, la succession des saisons et les pratiques agricoles adoptées dans chaque site. Les agrumes sont plus infestés par les nématodes phytoparasites au printemps lorsqu'ils sont cultivés dans un sol sableux-limoneux, humide (44,51%), avec un pH variant entre 7,52 et 7,85, pauvre en matière organique (0,07%), en absence de culture associée et avec des traitements fertilisants. Ils sont moins infestés en été lorsqu'ils sont cultivés dans un sol sableux- limoneux, moins humide (12,47%-33,81%), avec un pH variant entre 7,49 et 8,27, riche en matière organique (1,99%), en présence de cultures associées et sans traitements fertilisants. En tenant compte des divers facteurs que nous avons précédemment discutés, l'effet porte-greffes pourrait également s'avérer être un des facteurs explicatifs de la différence des degrés d'infestations et de l'abondance des NPP observés entre les différents sites. C'est exactement le thème que nous allons examiner minutieusement dans le chapitre suivant, dans le but de fournir une perspective exhaustive de cette tactique de combat contre *T. semipenetrans.*

CHAPITRE IV

ÉVALUATION DE LA RÉSISTANCE DE CERTAINS PORTE-GREFFES D'AGRUMES AU NÉMATODE *T. SEMIPENETRANS*

I. INTRODUCTION

L'agrumiculture est confrontée à des défis majeurs pour répondre aux besoins alimentaires de la population croissante tout en assurant la durabilité des ressources naturelles (Alzubi *et al*., 2023). Les NPP, notamment *T. semipenetrans* peuvent causer des dégâts considérables sur les arbres d'agrumes, entraînant une réduction conséquente du rendement et par voie de conséquence des pertes économiques importantes (Bozbuga *et al*., 2022). La résistance variétale est l'une des méthodes prometteuses contribuant au contrôle de ces ravageurs. En effet, la sélection de variétés résistante/tolérantes peut constituer un moyen efficace et durable pour réduire la population des NPP, limiter leur capacité d'infester les agrumes et minimiser les pertes de rendement causé par *T. semipenetrans* (Verdejo-Lucas *et al*., 2023c).

Dans la région méditerranéenne, en particulier au Maroc, la plupart des vergers agrumicoles sont greffés sur le Bigaradier (*Citrus aurantium*) en raison de ses capacités d'adaptation aux différents types de sol et de sa bonne compatibilité avec la plupart des variétés utilisées (Beniken *et al*., 2011). Cependant, ce porte-greffe est connu pour être sensible à l'infestation par le nématode phytoparasite *T. semipenetrans*, qui constitue alors une menace sérieuse et permanente pour les vergers agrumicoles méditerranéens (Iqbal *et al*. 2005). Par conséquent, la recherche de variétés porte-greffes résistantes à *T. semipenetrans* est désormais une nécessité voire même une urgence. En général, parmi les principales caractéristiques recherchées dans les nouveaux porte-greffes figurent la résistance et/ou la tolérance aux NPP et aux maladies virales et cryptogamiques, et le large potentiel d'adaptation aux condition climatiques (la sécheresse, températures extrêmes, etc) et édaphiques (pH, salinité, etc) (Beniken *et al*., 2011; Roberto *et al*., 2022). Plusieurs études ont montré que l'infestation des agrumes par le nématode *T. semipenetrans* affecte négativement la croissance des plantes via l'altération de plusieurs processus tel que la réduction de l'activité photosynthétique, la perturbation de l'équilibre hormonal, l'altération de la physiologie des racines et du statut hydrique et minéral des arbres (Forner-Giner *et al*., 2020). Dans ce contexte, la sélection de porte-greffes d'agrumes résistants à *T. semipenetrans* permettrait de limiter la multiplication de ce parasite et minimiser les dégâts qu'il peut engendrer contribuant ainsi à la sauvegarde des vergers agrumicoles du bassin méditerranéen et le développement d'une agrumiculture productive et durable. L'utilisation de porte-greffes appropriés et performants permettrait également d'améliorer la vigueur, la productivité, la précocité et le rendement des arbres d'agrumes et de renforcer leur tolérance aux contraintes du milieu tout en minimisant les

intrants chimiques (Roberto *et al*., 2022). Cependant, les études réalisées dans ce contexte sont rares et aucune étude à ce propos n'a encore été réalisée au Maroc. L'objectif du présent travail est donc d'évaluer la résistance des sept porte-greffes d'agrumes les plus utilisées au Maroc contre le nématode *T. semipenetrans* à travers l'étude de leur réaction, évaluée en termes de paramètres agronomiques, physiologiques et biochimiques, suite à l'inoculation par ce NPP.

Dans ce chapitre on cherche à apporter des éléments de réponse aux questions suivantes : les porte-greffes d'agrumes utilisés au Maroc sont-ils résistants ou sensibles à *T. semipenatrans* ? Est-il possible que certains d'entre eux puissent être utilisés comme moyen de lutte biologique dans la stratégie de gestion de ce nématode ?

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

Sept porte-greffes d'agrumes couramment utilisées au Maroc, à savoir *Citrus aurantium* (Bigaradier et Bigaradier australian), *Citrus volkameriana*, *Citrus macrophylla* et les Citrange 'Troyer', 'Carrizo' et 'C-35'ont été évalués pour leur résistance au nématode des agrumes *T. semipenetrans*. Les plantules de ces porte-greffes âgés de 12 à 14 mois nous ont été fournies par la pépinière du domaine agricole de Taroudant.

2. Inoculum de *T. semipenetrans*

L'inoculum du nématode *T. semipenetrans* (œufs et J2) a été préparé à partir des racines d'arbres d'agrumes adultes infestés. Les fragments de racines ont été lavés délicatement et coupés en segments de 0,5 cm. Les segments de racines ont été plongés dans une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium à 0,5 %, puis broyés à l'aide d'un mixeur pendant 30 secondes pour libérer les œufs des sacs d'œufs des nématodes femelles et dissoudre la matrice gélatineuse (Greco and D'Addabbo, 1990). La suspension résultante a été filtrée successivement à travers des tamis de pores de différentes tailles (100, 60, 45, 30, 20 et 5 µm). Le résidu a été rincé avec de l'eau distillée stérile pour éliminer les traces de NaOCl et pour séparer les nématodes des débris de racines. Les œufs qui n'ont pas été utilisés immédiatement ont été collectés et placés dans de l'eau distillée stérilisée pendant une période de trois jours pour permettre leur éclosion, conformément à la méthode décrite par Hussey and Barker (1973). Les J2 ainsi obtenues, qui représentent le deuxième stade de développement des juvéniles, ont été récoltées et stockées à une température de 4°C jusqu'à leur utilisation ultérieure (Seo, 2012).

3. Essai de la résistance des porte-greffes d'agrumes

L'expérience a été menée sous serre à la Faculté des Sciences et Techniques (FST) de Marrakech pendant 9 mois, de février à septembre 2021. La température journalière moyenne pendant cette période a varié entre 18 et 34°C. Les plantules issues de différents porte-greffes ont été transplantées dans des pots en plastique contenant un substrat composé d'un mélange de 2/3 de sable stérile et 1/3 de sol agricole stérile (texture sablo-limoneuse, faible teneur en Carbone organique, et pH légèrement alcalin (pH 7,42) collecté du domaine Benkebboura (31°35'16.1"N 7°44'11.3"O). Après une période d'adaptation de 15 jours, quatre trous ont été disposés autour des racines dans chaque pot, dans lesquels un inoculum de *T. semipenetrans* composé de 350 juvéniles a été déposé (Campos and Campos, 2005), les trous ont été ensuite recouverts de sol stérilisé pour éviter leur dessèchement. Les pots ont été disposés dans la serre de manière aléatoire et ont été arrosés tous les 2 ou 3 jours selon les besoins. Les plantules non inoculées ont servi de témoins. Chaque traitement a été répété cinq fois. Après 225 jours d'incubation, les plantules ont été récoltées et leurs réponses à l'inoculation avec *T. semipenetrans* ont été évaluées à travers la mesure de leurs paramètres agronomiques et des paramètres nématologiques.

4. Paramètres mesurés

a. Paramètres nématologiques

La densité de la population de nématodes de *T. semipenetrans* a été évaluée en mesurant le nombre de femelles par système racinaire et le nombre de J2 par 100g de sol. Les racines de chaque porte-greffe ont été collectées soigneusement, lavées à l'eau du robinet, puis colorée avec une solution de floxin B. Après 1-2 heures, le nombre de femelles de *T. semipenetrans* par centimètre de racine a été compté sous un microscope optique (Sunartoi and Ntasasmita, 2011). De même, les J2 de *T. semipenetrans* ont été extraits à partir du sol de chaque pot en utilisant la méthode de Baermann modifiée par Flegg and Hooper, (1970), puis leur nombre a été compté à l'aide d'un microscope optique.

Le niveau de résistance des plantes d'agrumes à *T. semipenetrans* a été déterminé en fonction du nombre de femelle par cm de racine, selon une classification modifiée de Mani *et al*., (1989) et citée par Muhammad Azhar, (2003). Quand le nombre des nématodes est :

- Compris entre 0 et 1 nématode par cm de racine, il indique une résistance
- Compris entre 1 et 2 nématodes par cm de racine, il indique une résistance modérée,

- > 2 nématodes par cm de racine, il indique une susceptibilité.

Le facteur de reproduction des nématodes (FR) a été calculé en utilisant la formule suivante (Oostenbrink, 1966) :

$$Facteur\ de\ reproduction\ (\%) = \frac{Pf(Population\ finale)}{Pi(Population\ initiale}$$

b. Paramètres Agronomiques

À la fin de l'expérience, les racines ont été séparées de la tige pour chaque variété porte-greffe. La longueur relative de la tige, le diamètre du tronc ainsi que la longueur des racines ont été mesurés. La biomasse fraîche des racines et des parties aériennes a été déterminée par pesée immédiate. Ensuite, la biomasse sèche des parties aériennes et des racines a été déterminée après un séjour de 72h dans une étuve à 80°C.

Les variations (%) des paramètres de croissance des porte-greffes d'agrumes (longueur relative de la partie aérienne, longueur des racines, la biomasse fraîche et sèche des racines et tiges, etc) ont été calculées en utilisant les formules suivantes (Abbott 1925) :

$$Réduction\ (\%) = 100 \times \frac{(Controle - Traitement)}{Controle}$$

$$Augmentation\ (\%) = 100 \times \frac{Traitement - Controle}{Controle}$$

c. Analyses Biochimiques

i. Teneur en proline

La teneur en proline a été déterminée selon la méthode de Bergman and Loxley (1970). Une quantité de 200 mg de matériel végétal (3ème feuille à partir de l'apex) a été broyée dans 2,5 ml d'éthanol à 95% suivie de trois rinçages et lavages avec 2,5 ml d'éthanol à 70%, la solution résultante du lavage a été ensuite centrifugée à 12 000 × g à 25 °C pendant 15 min. Le surnageant a été prélevé et mélangé avec 2 ml de ninhydrine et d'acide acétique glacial. La réaction a été effectuée à 100 °C pendant 1 heure dans un bain-marie bouillant et arrêtée en plaçant les tubes à essai sur la glace. Du toluène (4 ml) a été ajouté au mélange réactionnel et laissé reposer après agitation. La couche de toluène contenant le chromophore a été séparée, portée à la température ambiante et l'absorbance a été mesurée à 520 nm. Une courbe étalon a été établie en utilisation des concentrations connues de proline.

ii. Extraction et dosage des activités enzymatiques des peroxydases et polyphénoloxydases

Le matériel végétal frais (50 mg) a été broyé en présence de 1 ml de tampon phosphate 0,1 M à pH 6 contenant 5% de PVP insoluble. Le mélange est ensuite centrifugé à 12000 g pendant 30 minutes. Le surnageant est récupéré et utilisé comme extrait enzymatique des polyphénoloxydases et des peroxydases.

L'activité de la peroxydase (PO) a été mesurée en utilisant le gaïacol comme donneur d'hydrogène selon la méthode de Hori *et al*., (1997). Le milieu réactionnel comprend 100 µl d'extrait enzymatique, 300 µL de gaïacol (20 mM) et 2 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 6). La réaction a été initiée par l'ajout de 200 µl d'eau oxygénée (H2O2 à 0,3%) et la formation de tétragaiacol a été suivie par spectrophotométrie à 470 nm. L'activité a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction ε = 26,6 mM^{-1} cm^{-1}. L'unité enzymatique de la PO a été définie comme la quantité d'enzymes qui entraîne la formation de 1 mmole de tétragaiacol par minute par gramme de matière fraîche (mmol min^{-1} g^{-1} protéine).

L'activité de la polyphénoloxydase (PPO) a été mesurée selon le protocole de Hori *et al*., (1997). Le milieu réactionnel contient 500 µl de catéchol à 1,6 % (v/v) préparé dans le tampon phosphate (100 mM, pH 6). La réaction a été initiée par addition de 100 µl d'extrait enzymatique et incubée pendant 3 min à température ambiante. L'absorbance a été lue à 410 nm. L'unité enzymatique de la PPO a été définie comme étant la quantité d'enzymes utilisée pour l'augmentation d'une unité d'absorbance (475 nm) min^{-1} mg^{-1} de protéines.

iii. Malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation des lipides membranaires est estimée par la détermination de la teneur en MDA selon la méthode décrite par Savicka and Škute (2010). Des feuilles (0,5 g) ont été homogénéisées dans un volume égal (1,5 ml) d'acide trichloroacétique (TCA) à 0,1% et d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0,5%, puis 2,5 du TCA à 20 % a été ajouté. Le mélange a été incubé à 95 °C pendant 30 min et la réaction a été arrêtée en plaçant les tubes dans la glace. Le mélange a ensuite été centrifugé à 10 000 × g pendant 15 min et l'absorbance du surnageant a été lue à 532 nm. La concentration en MDA a été calculée en utilisant son coefficient d'extinction ε =155 mM^{-1} cm^{-1}.

iv. Catalase (CAT)

L'activité de la CAT a été déterminée selon la méthode de Chance and Maehly (1957). 200 mg de matériel végétal ont été broyés à froid en présence de 4 ml de tampon phosphate 0,1 M à pH 6 contenant 5% de PVPP et 2 mM d'EDTA. Le mélange a ensuite été centrifugé à 12000 g pendant 30 minutes pour obtenir l'extrait enzymatique. Pour un volume final de 2,2 ml, le mélange réactionnel est constitué de 200 µl d'extrait enzymatique et de 2 ml de H2O2 (10 mM) préparé dans le tampon phosphate (100 mM, pH 7). La réaction est initiée par addition de l'extrait enzymatique, et la vitesse de décomposition de l'H2O2 a été déterminée en mesurant la diminution de l'absorbance à 240 nm pendant 3 min. Les calculs de l'activité ont été réalisés en utilisant un coefficient d'absorption molaire de 39,6 mM^{-1} cm^{-1} pour H2O2. L'activité enzymatique est exprimée en mmol H2O2 réduit min^{-1} mg^{-1} de protéines.

5. Analyses statistiques

Les données quantitatives ont été exprimées en tant que moyennes d'expériences ± erreur standard. La signifiance de la différence entre les moyennes a été testée par analyse de la variance (ANOVA). Les tests à plages multiples de Tukey à $p < 0,05$ ont été réalisés à l'aide du logiciel SPSS (Version 25).

III. RESULTATS

1. Effet de l'inoculation par *T. semipenetrans* sur les paramètres nématologiques

Les résultats de l'effet de l'inoculation avec *T. semipenetrans* sur les paramètres nématologiques chez les porte-greffes d'agrumes étudiés sont reportés sur les **Tableaux 18** et **19**. Les résultats obtenus montrent que la densité de la population de *T. semipenetrans* a augmenté significativement ($P < 0,03$) à la fois dans les sol rhizosphériques (Pfs) et les racines (Pfr) chez toutes les variétés porte-greffes testées. L'analyse statistique a classé les porte-greffes en quatre groupes significativement différents ($p < 0,05$) en ce qui concerne la densité finale des NPP dans leurs sols rhizosphériques. Le premier groupe comprend le Bigaradier, le Bigaradier Australien et le Volkameriana avec plus de 1030,67nématodes/100g de sol. Le deuxième groupe est représenté par Macrophylla et Citrange C-35 avec respectivement 979 et 873,67 nématodes/100g de sol, le troisième groupe est composé de Citrange Troyer, compte moins de 782,43 nématodes par 100g de sol, alors que le quatrième groupe est constitué de Citrange Carrizo présente la densité la plus faible, avec moins de 541,56 nématodes par 100g de sol (**Tableau 18**).

En termes de capacité de reproduction, *T. semipenetrans* a présenté le taux de reproduction (FRs) le plus élevé (91,1) dans le sol rhizosphérique du Bigaradier, suivi de près par celui de Volkameriana (90,32) de Bigaradier Australien (88,39), et de Citrange C-35 (74,92), tandis que les sols rhizosphériques de Citrange Troyer (67,1), et de Citrange Carrizo (46,44) ont montré les FRs les plus bas (**Tableau 18**).

Tableau 18. Population finale (Pf) de *T. semipenetrans* (Ts) dans 100g de sol rhizosphérique (Pfs) et par 10g de racines (Pfr) et facteur de reproduction de Ts dans le sol rhizosphérique (FRs) et dans les racines (FRr) chez les porte-greffes d'agrumes les plus utillisés au Maroc, Bigaradier, Bigaradier Australien, Citrange Troyer, Citrange Carrizo, Citrange C-35, Volkameriana et Macrophylla, inoculés avec *T. semipenetrans* et cultuvés sous serre.

Porte-greffes	Pfs/ 100g de sol	FRs	Pfr/ 10g de racines	FRr
Bigaradier	1062,23± 45,72^{a}	91,1	466,26±2,84^{a}	40,19
Big Australien	1030,67± 32,07^{a}	88,39	250,48 ±1,63^{b}	21,48
Citrange Troyer	782,43±15,29^{b}	67,1	184,11±6,41^{c}	15,78
Citrange Carrizo	541,56±23,15^{c}	46,44	105,01 ±1,89^{d}	9,54
Citrange C-35	873,67± 51,88^{ab}	74,92	251,88±1,04^{b}	21,6
Volkameriana	1053,17± 48,33^{a}	90,32	237,27±14,42^{b}	20,34
Macrophylla	979,00± 22,68^{ab}	83,96	188,16±3,76^{c}	16,13

Les moyennes dans une colonne suivie de la/les même(s) lettre(s) ne sont pas significativement différentes selon Tukey ($P < 0,05$).

De même, l'analyse de variance a révélé une différence significative ($p < 0,0001$) entre les différents porte-greffes en termes de capacité de *T. semipenetrans* à se reproduire (FRr) dans leurs racines. *T. semipenetrans* a démontré une forte capacité à se reproduire dans les racines du Bigaradier, avec 466,26 nématodes/10g de racines, ainsi que sur le Bigaradier Australien (250,48 nématodes/10g de racines) et Citrange C-35 (251,88 nématodes/100g de sol). En revanche, ce NPP s'est reproduit faiblement sur le Citrange Troyer (188,16 nématodes/10g de racines), le Citrus Macrophylla (188,16 nématodes/10g de racines) et le Citrange Carrizo (105,01 nématodes/10g de racines) (**Tableau 18**).

En outre, Citrange Carrizo a également présenté le nombre le plus faible de femelles par cm de racines, soit environ 0,33 femelles par cm de racine, traduisant une réaction de résistance à *T. semipenetrans* selon la classification de Mani *et al*. (1989), tandis que les autres porte-greffes ont abrité plus d'une femelle par cm de racine (**Tableau 19**). Le Bigaradier, le Bigaradier Australien et le Volkameriana ont montré le plus grand nombre (> 3) de femelles

par cm de racines ce qui constitue une réaction de sensibilité à *T. semipenetrans* selon la classification de Mani *et al*. (1989).

Tableau 19. Nombre de femelles de *T. semipenetrans* (Ts) par cm de racines et type de réaction des porte-greffes d'agrumes les plus utilisés au Maroc, Bigaradier, Bigaradier Australien, Citrange Troyer, Citrange Carrizo, Citrange C-35, Volkameriana et Macrophylla, inoculés avec *T. semipenetrans* et cultivés sous serre.

Porte greffes	*T. semipenetrans* femelles par cm de racines	Réaction de porte-greffe
Bigaradier	3,33±0,02[a]	Sensible
Big australian	3±0,12[a]	Sensible
Citrange Troyer	1±0,07[c]	Tolérant
Citrange Carrizo	0,33±0,03[d]	Résistant
Citrange 35	1±0,00[c]	Tolérant
Volkameriana	3±0,25[a]	Sensible
Macrophylla	2±0,04[b]	Tolérant

Les moyennes dans une colonne suivie de la/les même(s) lettre(s) ne sont pas significativement différentes selon Tukey (P < 0,05).

2. Effet de l'inoculation par *T. semipenetrans* sur les paramètres agronomiques des plantes

Les résultats de la réponse à l'inoculation avec *T. semipenetrans*, exprimée en termes de variation des paramètres agronomiques, chez les différents porte-greffes d'agrumes étudiés sont reportés sur le **Tableau 20**. La masse fraîche (P < 0,0001), la masse sèche (P < 0,0001), et la longueur (P < 0,0001) des racines, ainsi que la longueur s (P < 0,0001), et la masse sèche (P < 0,0001) de la partie aérienne, et le nombre de branches (P < 0,05) ont significativement varié en fonction de l'inoculation avec *T. semipenetrans* et de la variété porte-greffe inoculée.

L'inoculation avec *T. semipenetrans* a entrainé une réduction significative de la masse fraîche (MFR) et de la masse sèche (MSR) des racines chez tous les porte-greffes comparés aux témoins non-inoculés (**Tableau 20**). La plus grande réduction de MFR a été enregistrée chez le Bigaradier Australien (67,6 %) suivie de Volkameriana (50,6 %), tandis que les taux de réduction les plus faibles ont été enregistrés chez Citrus Macrophylla (29,8 %) et Citrange Carrizo (34,47 %). Le Bigaradier (67,20 %) et le Bigaradier Australien (65,74 %) ont présenté les taux de réduction de MSR les plus élevés, alors que Citrange C-35 (8,9 %) et Macrophylla (20,34 %) ont enregistré les taux de réduction de MSR les plus faibles.

En outre, la longueur (LR) et le diamètre (DR) des racines ont été significativement réduits chez tous les porte-greffes inoculés comparés à leurs témoins respectifs (**Tableau 20**). La plus grande réduction de LR a été observée chez Citrange Troyer (33,75 %) suivie de Citrange Carrizo (26,1 %). En revanche, les taux de réduction les plus faibles ont été observés chez Citrange C-35 (1,48 %) et Orange aigre (2,08 %). La réduction du diamètre des racines a été plus élevée chez le Bigaradier (58,26 %) et le Bigaradier Australien (45,08 %) et plus faible chez Volkameriana (5,47 %) que chez Macrophylla (17,76), Citrange Carrizo (15,3), Citrange Troyer (12,72) et Citrange C-35 (12,7%).

La masse fraîche (MFPA) et la masse sèche (MSPA) des parties aériennes (MFPA) ont été significativement réduites chez tous les porte-greffes inoculés par rapport aux témoins (**Tableau 20**). La plus grande réduction de MFPA a été observée chez le Bigaradier (56,6 %), tandis que les taux de réduction les plus faibles ont été enregistrés chez Macrophylla (3,5 %) et Citrange Carrizo (7,9 %). La plus grande réduction de MSPA a été enregistrée chez Macrophylla (58,5%) et Bigaradier (54,8%), tandis que les taux de réduction les plus faibles ont été notés chez Citrange C-35 (4,59%) et Citrange Carrizo (5,05%).

L'inoculation avec *T. semipenetrans* a significativement réduit la longueur de la partie aérienne (LPA) et le nombre de branches (NB) par rapport au témoin chez tous les porte-greffes étudiés (**Tableau 20)**. Le Bigaradier Australien (53,06%) et le Bigaradier (42,80%) ont présenté la plus grande réduction de LPA, tandis que les taux de réduction les plus faibles ont été enregistrés chez Citrange Carrizo (16,9%) et C-35 Citrange (17,83%). Le taux de réduction de NB le plus élevé a été enregistré chez Citrange Carrizo (53,4 %), suivi du Bigaradier Australien (46,14 %), tandis que la réduction de NB la plus faible a été enregistrée chez le Bigaradier (23,63 %) et Volkameriana (33,25 %).

Tableau 20. Effet de l'inoculation avec *T. semipenetrans* sur la masse fraîche (MFR) et sèche (MSR), la longueur (LR) et le diamètre (DR) des racines, sur la masse fraîche (MFPA) et sèche (MSPA) et la longueur (LPA) des parties aériennes et sur le nombre de branche(NB) chez les porte-greffes d'agrume les plus utilisés au Maroc, Bigaradier, Bigaradier Australien, Citrange Troyer, Citrange Carrizo, Citrange C-35, Volkameriana et Macrophylla inoculés ou non avec *T. semipenetrans* et cultivés sous serre.

		Racines				L'allongement aerienne			
Porte-greffes	**Statut d'inoculation**	**MFR (g)**	**MSR (g)**	**LR (cm)**	**DR (cm)**	**MFPA (g)**	**MSPA (g)**	**LPA (ΔL cm)**	**NB (ΔB)**
Bigaradier	Inoculé	17,37±2,67^{g}	8,86± 0,71^{e}	20,23±0,64^{de}	9,6±0,8^{d}	46,37±6,70^{e}	12,66±3,74^{f}	26,5± 6,54^{bcd}	4,33±0,33^{b}
	Témoin	33,86±0,24^{cd}	27,01±1,05^{bc}	20,66±0,54^{d}	23±0,81^{ab}	106,86±0,81^{ab}	28,01±0,94^{abc}	46,33±4,83^{a}	5,67±2,72^{ab}
	Réduction (%)	48,70	67,20	2,08	58,26	56,61	54,80	42,80	23,63
Bigaradier Australien	Inoculé	19,78±0,40^{g}	11,82±0,94^{d}	23,33±0,72^{de}	11,83±1,17^{d}	93,35±0,71^{bc}	25,21±0,76^{cd}	12,83±2,31^{cde}	4,67±1,66^{b}
	Témoin	61,04±4,96^{a}	34,50 ±0,6^{a}	30,67±0,27^{ab}	21,54±0,41^{abc}	117,38±1,08^{a}	37,48±0,32^{a}	27,33± 3,60 ^{bc}	8,67±1,48^{a}
	Réduction (%)	67,60	65,74	23,93	45,08	20,47	32,74	53,06	46,14
Citrange Troyer	Inoculé	22,72± 0,27^{efg}	12,62±1,41^{d}	18,33±0,72^{e}	20,66±0,47^{bc}	93,67±0,33^{bc}	15,98±2,29^{f}	4,36 ±0,94^{f}	2±1,15^{b}
	Témoin	39,51±2,41^{bcd}	21,70±0,28^{c}	27,67±0,14^{bc}	23,67±0,81^{ab}	107,53±3,29^{ab}	32,70±0,32^{ab}	5,67± 1,44^{ef}	3,33±0,66^{b}
	Réduction (%)	42,50	41,84	33,75	12,72	12,89	51,13	23,10	39,94
Citrange Carrizo	Inoculé	21,33±0,66^{fg}	12,43 ±0,23^{d}	22,67±0,27^{d}	17,5±0,40^{c}	85,06±0,28^{bc}	32,69±0,53^{ab}	10,66±0,72^{de}	2,33±2,18^{b}
	Témoin	32,55±2,93^{cde}	31,92±0,81^{ab}	30,67±0,27^{ab}	20,33±0,54^{bc}	92,41±0,41^{bc}	34,43±2,71^{ab}	12,83± 2,52^{cde}	5±1,00^{ab}
	Réduction (%)	34,47	61,06	26,08	15,30	7,95	5,05	16,91	53,40
Citrange C-35	Inoculé	21,79± 0,06^{fg}	10,23±0,49^{d}	22±0,04^{de}	23,67±0,96^{ab}	87,62±0,13^{bc}	21,6±0,77^{cde}	6,9± 5,59^{e}	2,33±0,66^{b}
	Témoin	41,98± 1,02^{c}	11,24±0,32^{d}	22,33±0,10^{de}	20,67±0,1^{bc}	105,67±10,56^{ab}	22,64±5,27^{cde}	5,67± 5,19^{ef}	4±0,57^{b}
	Réduction (%)	48,09	8,99	1,48	12,67	17,08	4,59	17,83	41,75
Volkameriana	Inoculé	21,61± 0,53^{fg}	10,66±0,53^{d}	30±0,06^{ab}	23 ±1,45 ^{ab}	75,94±2,66^{d}	25,07±2,92^{cd}	29,33 ±2,59^{b}	2,67±0,33^{b}
	Témoin	43,74±1,78^{b}	21,03±0,97^{c}	33,33±0,54^{a}	24,33±5,65^{a}	110,74±5,10^{ab}	32,18±0,77^{ab}	15,33±2,79^{cde}	4±0,57^{b}
	Réduction (%)	50,59	49,31	9,99	5,47	31,42	22,09	47,73	33,25
Macrophylla	Inoculé	23,52± 0,79^{efg}	11,08±1,55^{d}	24,33±0,27^{cd}	20±3,27^{bc}	70,85±8,63^{d}	15,65±2,58^{f}	18,5 ±4,40^{cd}	3,33±0,66^{b}
	Témoin	33,52± 0,56^{cd}	13,91±0,76^{d}	29,33±0,36^{b}	24,32±2,86^{a}	73,44±2,80^{d}	37,75±0,21^{a}	23,66 ±1,65^{cd}	5,67±1,76^{ab}
	Réduction (%)	29,83	20,34	17,05	17,76	3,51	58,54	21,81	41,27

Les moyennes dans une colonne suivie de la/les même(s) lettre(s) ne sont pas significativement différentes selon Tukey ($P \leq 0,05$).

3. Effet du *T. semipenetrans* sur les paramètres physiologiques et biochimiques

Les résultats de l'analyse de la teneur en proline et en malondialdéhyde (MDA), ainsi que de l'activité des enzymes antioxydantes, catalase (CAT), polyphénoloxydase (PPO) et peroxydase (PO), chez les différents porte-greffes inoculés ou non avec *T. semipenetrans* sont reportés sur le **Tableau 21.** Les résultats indiquent que les teneurs en proline ($P<0,0001$) et en MDA ($P<0,0001$) ainsi que les activités CAT ($P<0,004$), PO ($P<0,0001$) et PPO ($P<0,0001$) ont significativement varié en fonction de l'inoculation avec *T. semipenetrans* et de porte-greffe. En effet, les teneurs en proline (Pro) et en MDA et les activités CAT, PO et PPO, ont significativement augmenté chez les porte-greffes inoculés avec *T. semipenetrans* comparés à leurs témoins respectifs. Les trois Citranges ont montré une faible accumulation de proline (< 4µmol /g MF) comparés aux Bigaradier et Volkameriana qui ont montré les teneurs en proline les plus élevées, soit respectivement 83,3 et 53,5µmol /g MF (**Tableau 21**). Le taux d'accumulation de MDA a été le plus élevé chez le Bigaradier (398,15 %) et Citrus Volkameriana (394,24 %), et le plus faible chez Citrange C-35 (65,43 %), Citrange Carrizo (41,65 %) et Citrange Troyer (30,23%).

L'activité PO la plus élevée a été observée chez le Bigaradier (16,22 µmol min^{-1} mg^{-1} Prot), suivie de Volkameriana (12,3 µmol min-1 mg-1 Prot), représentant une augmentation respective de 382,7 % et 225,4 % par rapport aux témoins. En revanche, la plus faible augmentation de l'activité PO a été enregistrée chez Citrange Carrizo (56,6 %) et Citrange C-35 (81,3 %). L'activité PPO la plus élevée a été observée chez Volkameriana (285,6 %), le Bigaradier (256,9 %) et le Bigaradier australien (221,1 %). En revanche, la plus faible augmentation de l'activité PPO a été enregistrée chez le Citrange Carrizo (237,5 %). En outre, l'augmentation la plus élevée de l'activité CAT a été enregistrée chez le Citrange Troyer (17100%), suivie de la Volkameriana (7420 %), du Bigaradier (6233,33 %) et du Bigaradier australien (3183,3 %). Cependant, le taux d'augmentation le plus faible de l'activité CAT, comparé au témoin, a été noté chez le Citrange Carrizo (70,37%).

Tableau 21. Teneur en proline, activités de la peroxydase, de la polyphénol oxydase et de la catalase, et accumulation de MDA chez les porte-greffes d'agrumes les plus utilisés au Maroc Bigaradier, Bigaradier Australien, Citrange Troyer, Citrange Carrizo, Citrange C-35, Volkameriana et Macrophylla, inoculés ou non avec *T. semipenetrans* et cultivés sous serre.

Porte greffes	Statut d'inoculation	Proline (µmol /g PF)	Peroxydase (µmol, min^{-1},mg^{-1} Prot)	Polyphenoloxydase (µmol min^{-1} ,mg^{-1} Prot)	Catalase (µmol H_2O_2/mg Prot,min)	MDA (µmol/g PF)
Bigaradier	Inoculé	27,22 ±2,76^{d}	3,36±1,24^{d}	5,29 ±1,008^{d}	0,09±0,003^{d}	4,86±0,42^{ef}
	Témoin	49,89 ±5,85^{a}	16,22±1,5^{a}	18,88±1,56^{a}	5,7±1,12^{a}	24,21±2,67^{a}
	Augmentation (%)	83,3	382,74	256,90	6233,33	398,15
Bigaradier Australien	Inoculé	30,77 ±1,37^{de}	3,83±1,25^{d}	4,69±0,47^{e}	0,12±0,03^{d}	8,26±0,39^{de}
	Témoin	47,11 ±0,72^{ab}	8,91±1,79^{b}	15,06±1,32^{ab}	3,94±1,75^{ab}	19,48±3,23^{ab}
	Augmentation (%)	53,10	132,6	221,1	3183,3	135,8
Citrange Troyer	Inoculé	22,11 ±0,77^{e}	3,62±0,22^{d}	3,72±2,14^{e}	0,01±0,02^{d}	8,4±0,30^{de}
	Témoin	23 ±1,18^{e}	7,70±2,51^{c}	10,27±2,55^{cd}	1,72±1,04^{bc}	12,04±1,37^{bcd}
	Augmentation (%)	4	112,71	63,78	17100	30,23
Citrange Carrizo	Inoculé	24,67± 3,96^{e}	4,4±0,46^{c}	5,02±3,31^{d}	0,24±0,14^{cd}	6,65±0,18^{ef}
	Témoin	25,33 ±1,77^{e}	6,89±0,66^{bc}	6,89±0,63^{d}	0,81±1,43^{cd}	9,42±1,26^{de}
	Augmentation (%)	2,7	56,6	37,25	237,5	41,65
Citrange C-35	Inoculé	24,22 ±2,65^{e}	3,91±0,27^{d}	4,43±2,45^{e}	0,14±0,06^{d}	6,45±1,75^{ef}
	Témoin	25,11 ±0,92^{e}	7,09±2,07^{bc}	10,01±2,27^{cd}	2,44±0,05^{ab}	10,67±0,66^{cd}
	Augmentation (%)	3,67	81,33	125,96	1642,86	65,43
Volkameriana	Inoculé	30± 2,01^{de}	3,78±0,45^{d}	3,19±0,56^{e}	0,05±0,01^{d}	3,82±0,14^{f}
	Témoin	40,66± 1,51^{c}	12,30±1,27^{ab}	12,3±1,27^{bc}	3,76±1,64^{ab}	18,88±0,89^{abc}
	Augmentation (%)	53,5	225,4	285,6	7420	394,24
Macrophylla	Inoculé	28,67 ±3,20^{de}	3,58±0,06^{d}	4,78±2,30^{e}	0,07±0,01^{d}	3,09±0,42^{f}
	Témoin	33,22 ±1,27^{d}	10,91±0,84^{abc}	10,91±0,842^{cd}	1,12±0,11^{bcd}	8,23±0,26^{de}
	Augmentation (%)	15,9	204,7	128,2	1500	166, 3

Les moyennes suivies par des lettres différentes, dans la même colonne sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

IV. DISCUSSION

Les agrumes sont vulnérables à une gamme de stress biotiques et abiotiques qui peuvent affecter leur développement, leur croissance et leur rendement. L'un des principaux stress biotiques qui affecte la croissance et la productivité des agrumes est l'infestation par les nématodes phytoparasites, en particulier le nématode des agrumes *T. semipenetrans*. Le niveau de résistance à *T. semipenetrans* varie selon les porte-greffes. Cette étude vise à sélectionner des porte-greffes d'agrumes ayant un potentiel élevé de résistance à *T. semipenetrans* en termes de capacité à prévenir la reproduction du nématode à la fois dans le sol et dans les racines, et à limiter l'infestation des racines par ce ravageur. Elle a également pour objectif de contribuer à une compréhension approfondie des changements morphologiques et biochimiques qui se produisent chez ces plantes d'agrumes en réponse à l'inoculation par ce phytoparasite. Les résultats obtenus montrent que l'inoculation avec *T. semipenetrans* a négativement affecté la croissance et la production de biomasse chez toutes les variétés porte-greffes étudiées. En effet, comparé aux témoins, des diminutions significatives de la longueur des parties aériennes (LPA), la longueur des racines (LR), du diamètre des pousses (DPA), de la néoformation de nouvelles pousses (NB), de la biomasse fraîche aérienne (MFPA) et des racines (MFR), ont été observées chez tous les porte-greffes étudiés. De plus, chez toutes les variétés porte-greffes, l'inoculation avec *T. semipenetrans* a induit un stress oxydatif mis en évidence par l'augmentation de l'accumulation du malondialdéhyde (MDA) et par l'augmentation des activités des enzymes antioxydantes, pour lutter contre ce stress oxydatif, telles que la catalase (CAT), la peroxydase (PO) et la polyphénol oxydase (PPO), comparé aux témoins. Nos résultats montrent que la réaction à l'inoculation avec *T. semipenetrans*, a significativement varié entre les variétés porte-greffes utilisée. En effet, le Citrange Carrizo inoculé a présenté la croissance et la production de biomasse les plus élevées et le nombre le plus faible de femelles (0,33) par cm de racines, démontrant sa grande capacité à limiter la multiplication de ce NPP à la fois dans son sol rhizosphérique (541,56 nématodes /100g de sol) et dans ses racines (105,01 nématodes/ 10g de racines). Ces résultats mettent en évidence le potentiel élevé de ce porte greffe pour limiter l'infestation de ses racines par ce nématode (FRr=9,54). En revanche, le Bigaradier, le Bigaradier Australien et le *Citrus Volkameriana* ont été les plus sensibles à l'infestation ((FRs > 88,39), les plus favorables à la reproduction de *T. semipenetrans*, (FRr > 20,34 ; FRs > 88,39) aussi bien dans leurs sols rhizosphériques (FRs) que dans leurs racines (FRr) engendrant des populations finales respectives dans le sol (Pfs) de 1062,23 nématodes /100g de sol pour le

Bigaradier, 1030,67 nématodes/100g de sol pour le Bigaradier Australien et 1053,17nématodes/100g de sol pour le *Citrus Volkameriana*. Les populations finales de *T. semipenetrans* dans les racines (PFr) étaient significativement élevées, atteignant 466,26 par 10g de racines chez le Bigaradier, 250,48/ 10g de racines chez le Bigaradier Australien et 237,27/ 10g de racines chez le *Citrus Volkameriana*. Ces variétés porte-greffes ont également présenté une diminution importante de leurs paramètres de croissance et de production de biomasse.

Le Citrange Troyer, le Citrange C-35 et le *Citrus macrophylla* ont présenté une tolérance modérée, avec une population de *T. semipenetrans* femelle allant jusqu'à 1 femelle par cm de racine. En effet, l'infestation par *T. semipenetrans* affecte la croissance et la fonctionnalité du système racinaire des plantes d'agrumes en raison de l'augmentation de la population des NPP et de leurs sites d'alimentation engendrant une succion forte et continue des nutriments compromettant la capacité du système racinaire à absorber et à transloquer l'eau et les nutriments vers les différents organes de la plante affectant ainsi négativement sa croissance et son développement (Afzal *et al*., 2021). L'infestation des agrumes par *T. semipenetrans* est ainsi, généralement, associée à une forte réduction de la croissance et de la production de biomasses racinaires et aériennes (Deka *et al*., 2003; Ayazpour *et al*., 2010; Montasser *et al*., 2012).

La réponse différentielle des porte-greffes d'agrumes à l'infestation par le nématode *T. semipenetrans* se manifeste également par des différences de changements physiologiques et métaboliques, en particulier le degré de stimulation du métabolisme antioxydant, notamment l'activation d'enzymes telles que la catalase, la polyphénol oxydase et la peroxydase, connues pour être impliquées dans l'atténuation des dommages oxydatifs causés par l'infestation des nématodes (Mateille, 1992; Bali *et al*., 2020; Saranya *et al*., 2021). En effet, les porte-greffes tels que le Bigaradier, le Bigaradier Australian et *Citrus volkameriana*, considérés sensibles à l'infestation par *T. semipenetrans* (tenant compte des résultats des paramètres nématologiques et de la classification de Mani *et al*. (1989)), ont tendance à développer des activités enzymatiques antioxydantes (PO, PPO et CAT) significativement plus élevées que les porte-greffes résistants tel que Citrange Carrizo. Ces observations suggèrent que les plantes sensibles à l'infestation par *T. semipenetrans* peuvent être plus sensibles au stress oxydatif et présenter une activité métabolique accrue en réponse à l'attaque par ce nématode parasite des plantes. Cela implique que chez les porte-greffes sensibles, l'infestation par *T. semipenetrans* entraîne

une production accrue de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont nocives pour les cellules végétales. Ces molécules sont extrêmement réactives et perturbent gravement le métabolisme et les structures cellulaires (Bartels and Sunkar, 2005; França et al., 2007). Pour combattre ce stress, les plantes développent plusieurs mécanismes de défense impliquant des enzymes et des composés antioxydants capables de protéger les cellules végétales des dommages oxydatifs en activant les processus d'élimination des ROS (Mittler, 2002; Gill and Tuteja, 2010). Ces résultats sont cohérents avec ceux de Romuald (2009), qui a montré que l'induction des activités des peroxydases et des polyphénol oxydases a été plus élevée chez les variétés de bananes sensibles à *Pratylenchus coffeae* chez les variétés résistantes. Cependant, la stimulation du métabolisme antioxydatif exprimé en termes d'accumulation d'antioxydants non enzymatiques et d'augmentation des activités des enzymes impliquées dans l'élimination des ROS est parfois interprété comme signe de résistance et non de sensibilité. En effet, selon Mateille (1994) et Damodaran *et al*. (2009) l'activité des enzymes antioxydantes a été plus élevée chez les variétés résistantes que chez les variétés sensibles aux NPP.

L'accumulation de MDA est généralement utilisée comme indicateur de la peroxydation des lipides membranaires (Smirnoff, 1995). Des niveaux élevés de ce métabolite indiquent une augmentation de la peroxydation des lipides membranaires, reflétant des dommages oxydatifs significatifs au niveau cellulaire (Demiral et Türkan, 2005). Nos résultats montrent que le MDA a été fortement accumulé chez les porte-greffes d'agrumes sensibles tels que le bigaradier, le bigaradier australian et Volkameriana par rapport aux porte-greffes résistants tel que Citrange Carrizo, suggérant que cette variété n'a pas subi de stress oxydatif significatif dû à *T. semipenetrans*. Cela pourrait être expliqué par la décomposition des ROS suite à l'augmentation des activités CAT et PO chez cette variété (Mirzaei *et al*., 2013). Des études antérieures de Zacheo *et al*., (1987, 1983) ont montré que chez les variétés de plantes résistantes aux NPP (variétés de tomate résistantes à *M. incognita* et variétés de pomme de terre résistantes à *Globodera pallida* et à *G. rostochiensis*) l'activité des enzymes antioxydantes diminuait avec le temps, alors qu'elle restait constamment élevée chez les variétés sensibles à ces nématodes.

Il apparaît que la réaction des plants d'agrumes à *T. semipenetrans* impliquent plusieurs compartiments et divers processus métabolique et physiologique, probablement en relation avec les différents niveaux d'intervention de *T. semipenetrans* sur ces plantes. Les différents mécanismes mis en œuvre, vraisemblablement liés, sont trop vastes pour établir une règle

générale sur la réponse des agrumes à l''action des NPP. Les mécanismes peuvent être pré ou post-infectieux. Les mécanismes pré-infectieux ont pour but d'empêcher *T. semipenetrans* de pénétrer dans les racines, soit en raison de la barrière mécanique de certains épidermes racinaires, soit en raison de la synthèse d'exsudats racinaires non attractifs, répulsifs ou même contenant des substances allélochimiques toxiques aux nématodes (Kaplan, 1981). Dans les mécanismes post-infectieux, la plante réagit à la pénétration profonde des nématodes en produisant des substances toxiques, telles que les phytoalexines, ou en déclenchant une réponse d'hypersensibilité qui se traduit par la production de divers composés cellulaires et l'activation du système de défense dans les minutes qui suivent l'infestation (Kaplan, 1981). Enfin, les tissus para-corticaux peuvent dévier leur métabolisme pour rétablir l'intégrité anatomique des tissus lésés ou pour arrêter la progression du parasite par intoxication ou en lui offrant un environnement inadéquat. Une résistance médiée par des gènes peut également être impliquée. En effet, plusieurs études ont montré que la résistance des porte-greffes à *T. semipenetrans* est probablement due à un gène principal ou à plusieurs gènes agissant en tandem. Ces gènes pourraient coder pour des protéines impliquées dans la défense des plantes contre les nématodes, telles que des enzymes de détoxification ou des protéines de reconnaissance des pathogènes (Verdejo-Lucas *et al*. 2003; Javed *et al*. 2008).

V. CONCLUSION

D'après les résultats obtenus dans cette partie de notre travail, l'infestation des porte-greffes d'agrumes par *T. semipenetrans* a entraîné une diminution significative de leur croissance et des changements importants de leur statut physiologique et biochimiques, notamment une accumulation accrue de MDA et une activité renforcée des enzymes antioxydantes pour lutter contre le stress oxydatif induit par ce nématode.

Les sept porte-greffes d'agrumes testés ont présenté des niveaux de résistance variables à l'infestation par *T. semipenetrans*. Le Citrange Carrizo a montré une forte résistance à l'infestation et à la reproduction de *T. semipenetrans*, tandis que le Citrange Troyer, le Citrange C-35 et le Macrophylla ont présenté une tolérance modérée. En revanche, le Bigaradier, le Bigaradier Australien et le Volkameriana se sont avérés être les plus sensibles à ce nématode, montrant des taux d'infestation et de reproduction élevés. De plus, nos expériences ont révélé que les porte-greffes sensibles, Bigaradier, Bigaradier Australien et Volkameriana sont plus sensibles au stress oxydatif et présentent une activité métabolique antioxydante accrue en

réponse à l'attaque par ce nématode phytoparasite. Cependant, les porte-greffes résistants tels que le Citrange Carrizo ont montré un taux d'infestation plus faible, et une moindre sensibilité au stress oxydatif induit par l'attaque de *T. semipenetrans* et des performances de croissance relativement élevées. Cela implique que le Citrange Carrizo pourrait constituer un outil judicieux et efficace, en tant que porte-greffe d'agrumes résistant, pour lutter durablement contre le nématode des agrumes *T. semipenetrans*.

CHAPITRE V

EVALUATION DU POTENTIEL NEMATICIDE DU MICROBIOME RHIZOSPHERIQUE DES AGRUMES

I. INTRODUCTION

Tylenchulus semipenetrans est une espèce semi-endoparasite qui est, parmi les NPP qui attaquent les racines des agrumes, celle qui leur inflige les dommages les plus considérables (Rumiani *et al*., 2023). Elle est omniprésente dans toutes les régions productrices d'agrumes du monde, y compris au Maroc (Mokrini *et al*., 2018a; Abd-Elgawad, 2020; Rumiani *et al*., 2023). La pression parasitaire exercée par ce nématode sur l'agrumiculture est en nette augmentation et se manifeste par différents types de symptômes sur la plante, tels que le flétrissement, le jaunissement, les carences nutritives et les nécroses racinaires, ouvrant également la voie à d'autres organismes phytopathogènes. En conséquence, ces NPP entraînent des pertes de rendement de plus en plus significatives, de l'ordre de 10 à 30% (Philis, 1989; Taylor, 2019;Jaiman *et al*., 2022). Les œufs et les juvéniles de *T. semipenetrans* sont les stades les plus sensibles où on peut agir pour contrôler efficacement ces NPP (Rumiani *et al*., 2023).

Les Méthodes de lutte appliquées contre les NPP des agrumes sont souvent basées sur l'utilisation des nématicides à base de produits chimiques extrêmement nocifs pour l'environnement et le consommateur. Leur action est de courte durée et elles affectent considérablement la qualité et le prix de revient de la récolte (Ali *et al*. 2022; Feng *et al*. 2022). Pour cette raison, l'intégration d'agents de lutte biologique dans les stratégies de gestion des NPP constitue désormais une alternative durable prometteuse pour contrôler ces phytoparasites.

Nous avons montré dans les chapitres précédents que les caractéristiques pédologiques, le type de porte-greffes et les pratiques culturales (cultures associées, etc.) affectent considérablement la dynamique des populations des NPP et leur capacité d'infester les racines et les sols rhizosphériques des agrumes. Cette action serait due, entre autres, à leur effet sur le microbiome rhizosphériques (Hunt and Handoo, 2009), en privilégiant le développement des populations des microorganismes antagonistes présents naturellement dans le sol. L'utilisation des biopesticides, notamment l'utilisation de certains microorganismes et leurs métabolites (pesticides et régulateurs de croissance d'origine microbienne), constitue des outils efficaces dans la lutte intégrée contre les ravageurs (Ayilara et al., 2023). Ces communautés microbiennes, habitants naturels du sol, sont de véritables agents de biocontrôle qui suppriment les populations de nématodes et déterminent l'effet suppressif des sols (Rashidifard *et al*., 2022). La suppression des PPN par ces communautés microbiennes est obtenue grâce à différents mécanismes basés sur leur capacité à rivaliser efficacement pour une niche

écologique, à coloniser la surface des plantes, à produire des composés nématicides (antibiotiques, toxines, sidérophores, enzymes hydrolytiques, etc.). et à renforcer les mécanismes de défense de l'hôte, provoquant une résistance systémique induite (ISR) (Migunova and Sasanelli, 2021). Parmi ces micro-organismes, on trouve : des bactéries telles que *Bacillus* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces avermitilis* et *Pasteuria* spp., qui produisent des substances antimicrobiennes et des enzymes qui tuent ou inhibent la croissance des NPP ; des mycètes tels que *Trichoderma* spp. et *Purpureocillium lilacinum* qui agissent contre les nématodes en produisant des enzymes qui les dégradent et en parasitant leurs œufs ; et des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA), tels que *Glomus* spp., qui améliorent le statut physiologique de leurs plantes hôtes leur offrant une meilleure protection contre le stress causé par les nématodes. L'utilisation des micro-organismes antagonistes offrirait des perspectives prometteuses dans la lutte biologique contre les NPP des agrumes (Migunova and Sasanelli, 2021). Cependant, rares sont les travaux qui se sont intéressés à l'évaluation de l'effet nématicide de ces microorganismes, la sélection des plus performants et leur utilisation pour contrôler le nématode des agrumes *T. semipenetrans*. Ainsi, l'objectif du présent chapitre est d'évaluer l'efficacité nématicide du microbiome des sols rhizosphériques des agrumes contre *T. semipenetrans*. Cela implique de : 1) faire l'inventaire, d'isoler et d'identifier les microorganismes (bactéries, mycètes et champignons mycorhiziens arbusculaires) associés à la rhizosphère des agrumes, et 2) d'évaluer leur performance en tant qu'agents de biocontrôle contre *T. semipenetrans* à travers des tests de confrontation *in vitro* et *in vivo*.

Les interrogations scientifiques posées dans ce chapitre sont : Quelle est la structure du microbiome associé à la rhizosphère des agrumes ? Existe-t-il des microorganismes spécifiques dotés d'activité nématicide contre *T. semipenetrans* ? Et est-ce que certains d'entre eux pourraient être exploités comme une modalité de lutte biologique dans la stratégie de gestion de *T. semipenetrans* ?

II. MATERIEL ET METHODES

1. Collecte des échantillons de sols et de racines des agrumes

La méthode de collecte des échantillons de sol et de racines des agrumes est comme décrite dans le chapitre I (**section 2**). Les mêmes échantillons de sols et de racines ont été utilisés pour l'isolement des bactéries, des champignons et des CMA ainsi que pour l'extraction des NPP.

2. Isolement des bactéries et champignons rhizosphériques

a. Préparation des milieux d'isolement

Les milieux de culture utilisés pour l'isolement des bactéries (milieu Luria Bertani, LB) et des champignons (milieu Extrait de Malt gélosé, EMG) ont été enrichis avec l'extrait de sol à 7 % (v/v) pour l'isolement à partir de sol et avec l'extrait de racines à 7 % (v/v) pour l'isolement à partir de racines :

L'extrait de sol ou de racines a été préparé la veille par broyage de 20 g de sol ou de racines dans 100 ml d'eau de puit. Le broyat obtenu a été hydrolysé à l'autoclave pendant 1 h à 120 °C. L'hydrolysât est ensuite filtrée par un système de filtration.

Le milieu LB solide enrichi avec l'extrait de sol ou de racines (7 % v/v) a été utilisé pour l'isolement des bactéries à partir de sol ou de racines (**Annexe II**). Alors que, le milieu LB liquide additionné de l'extrait de sol ou de racines (7 % v/v) a été utilisé pour les cultures liquides des bactéries (**Annexe II**).

Pour l'isolement des champignons (mycètes) à partir du sol et de racines, le milieu (EM) Extrait de Malt a été enrichi avec l'extrait de sol ou de racines (7 % v/v). Après autoclavage à 120°C pendant 15 min et refroidissement à environ 80°C, le milieu a été additionné d'une solution de sulfate de streptomycine à 0,075% (masse/volume physiologique stérile) à raison de 4% (v/v) (**Annexe II**). Le milieu (EM) Extrait de Malt liquide enrichi avec l'extrait de sol ou de racines (7 % v/v) a été utilisé pour les cultures liquides des champignons (**Annexe II**).

b. Préparation d'homogénéisât

Pour la préparation des homogénéisât à partir du sol ou de racines, 10 g de racines découpées en petits morceaux ou 10 g de sol tamisé ont été broyés dans une quantité suffisante d'eau de puit stérile pour réaliser la suspension-dilution 10^{-1}. Le broyage a été effectué avec un mixeur à pied, pendant 5 périodes d'une minute, espacées de 10 secondes, dans des conditions aseptiques. Les suspensions ont ensuite été agitées pendant 2 heures pour libérer le maximum de charge microbienne (Iraqi, 2001).

c. Préparation des différentes suspension-dilutions

L'homogénéisât initial obtenu à partir de sol ou de racines correspond à la dilution 10^{-1}. Des suspension-dilutions en série, allant de 10^{-1} à 10^{-5}, ont ensuite été réalisées en ajoutant à

chaque fois 1 ml de la suspension-dilution 10^n à 9 ml d'eau physiologique stérile pour obtenir la suspension-dilution 10^{n-1}, conformément aux normes standard en microbiologie.

d. Ensemencement et incubation

Un volume de 0,1 ml de chaque dilution (10^{-1} à 10^{-5}) de sol ou de racines a été déposé au centre d'une boîte de Pétri (90 mm de diamètre) contenant le milieu de culture gélosé (LB pour les bactéries et EM pour les champignons). Cinq répétitions (boites) ont été utilisées par dilution. Les boîtes ont ensuite été étalées et incubées à 30°C, à l'obscurité, pendant 48 heures pour les bactéries et 7 jours pour les champignons.

e. Purification des isolats bactériens et fongiques

Les isolats bactériens ont été purifiés par la méthode des stries sur le même milieu d'isolement. Alors que, les isolats fongiques ont été purifiés en repiquant un inoculum de la partie apicale du mycélium au centre de la boite en position retournée sur le même milieu d'isolement. Les boites repiquées ont été incubées à 30 °C pendant 48 heures pour les bactéries et pendant 7 j pour les champignons.

f. Stockage et conservation des isolats bactériens et fongiques

Les isolats bactériens et fongiques ainsi obtenus, ont ensuite été conservés dans le glycérol 30% à 20°C dans le but de les identifier ultérieurement et d'évaluer leur potentiel nématicide.

3. Identification des isolats bactériens et fongiques

a. Identification morphologique et biochimique des bactéries nématicides

Les bactéries isolées ont été purifiées par des repiquages, les bactéries qui ont montré une activité nématicide prometteuse ont été identifiées selon le protocole décrit par Prévot (**1973**) (**Annexe III**). Ainsi ont été révélés, pour chaque isolat bactérien présentant une activité nématicide les caractéristiques suivantes : la coloration Gram, le test de motilité, les endospores, la pigmentation, la croissance des bactéries à des pH de 3,7 et 10 le pH a été ajusté par KOH (N) ou H3PO4 (N)), la croissance à différentes températures (4, 25, 37, 45 et 65 °C) et la croissance à différentes concentrations de NaCl (NaCl : 5‰, 65‰, 200‰).
Le test de catalase et le test de l'oxydase ont été aussi réalisés.

Les isolats bactériens ont été évalués *in vitro* pour leur potentiel à promouvoir la croissance des plantes à travers leur capacité à produire l'acide indolacétique (AIA) et

solubiliser le phosphate et le potassium. La production de l'AIA a été évaluée dans du TSB (bouillon de soja tryptique) supplémenté en L-tryptophane (100 mg/L) et a été mesurée dans le surnageant après incubation à 28 °C avec agitation continue pendant 72 h. Le test de solubilisation de phosphate a été effectué sur le milieu NBRIP (National Botanical. Research Institut's Phosphate) solide et liquide en utilisant le phosphate tricalcique (Lebrazi *et al*., 2020). Le test de solubilisation du potassium a été effectué sur le milieu Aleksandrov (Meena *et al*., 2013), un indice de solubilisation est calculé (ISK= Diamètre de lyse/ Diamètre de colonie).

b. Identification morphologique des isolats fongiques

Pour identifier chaque colonie fongique isolée puis purifiée, nous avons adopté la méthode classique basée sur les caractéristiques macroscopiques et microscopiques.

i. Examens macroscopiques

L'examen macroscopique a concerné les caractères suivants :

- ✓ Sur le recto : la couleur, la consistance (glabre, duveteuse, poudreuse, plâtreuse, soyeuse, etc.), la surface (plane, dôme, plissé, cérébriforme, etc.), et la présence de rayons fins ou larges.
- ✓ Sur le verso : Couleur, arborisation en profondeur, pigment, etc.
- ✓ La croissance exprimée en cm par jour ou en nombre de jours qu'il a fallu pour envahir la boîte de Pétri.

ii. Examens microscopiques

L'observation microscopique des isolats fongiques a été réalisée par la technique de coloration au lactophénol bleu de coton qui consiste à prélever un fragment de la colonie à l'aide d'une anse de platine et à le déposer sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant. Ensuite, on recouvre la préparation avec une lamelle couvre-objet qui écrase la préparation (Lachapelle, 2004). Cette technique permet de visualiser les structures fongiques qui seront colorées en bleu clair (Botton *et al*. 1990; Bovio *et al*., 2017).

Les critères microscopiques étudiés :

- ✓ La description du mycélium :
  - Diamètre des filaments,
  - Présence ou non de cloison,
  - Pigmentation des hyphes (granulations),
  - Ramifications et leur mode : banal ou dichotomique,

- ✓ L'appareil sporifère :
  - Sporangiophore avec un sporange,
  - Conidiophore avec des colonnes de spores ramifié ou non ramifié.
- ✓ Les spores :
  - Internes : Sporangiosphores dans sporange,
  - Externes : Conidies ou conidiospores disposés sur conidiophore.

Pour déterminer le genre de chaque colonie fongique obtenue, nous avons adopté le système de classification de Saccardo (Barnett and Hunter, 1972). L'identification des espèces a été effectuée par référence à différentes clés d'identification (Botton *et al*., 1990; Hoffmann *et al*., 2009).

4. Préparation des inoculums bactériens et fongiques

a. Préparation de l'inoculum bactérien

Les isolats bactériens ont été cultivés en trois répétitions dans des erlenmeyers (250 ml) contenant chacun 100 ml de milieu d'isolement et incubés sous agitation (150 tr/min) à une température de 30°C et à l'obscurité. Après 48h, les cellules bactériennes ont été récupérées par centrifugation à 5000 trs/min pendant 10 min, puis rincées trois fois avec le tampon phosphate 0,1 M (pH 7) pour éliminer les contaminants du milieu ainsi que les métabolites libérés dans le milieu (El-Bendary, 2006; Wajid *et al*., 2020). Trois échantillons de 1,5 ml de cellules bactériennes provenant de chaque isolat ont été introduits individuellement dans des tubes Falcon stériles de 15 ml, chacun contenant 2 ml de tampon phosphate 0,1 M (pH 7). Par la suite, 1 ml de 2,3,5-triphenyl-tétrazolium-chloride (TTC) à une concentration de 0,5 % (m/v) dans de l'eau distillée stérile a été ajouté à chaque tube. Ces tubes ont été incubés à 30 °C pendant 2 heures sur un agitateur rotatif à une vitesse de 200 tours par minute. Le contenu de chaque tube a ensuite été centrifugé pendant 5 minutes à 8000 trs/min à une température de 4 °C. Après l'élimination du surnageant, les cellules viables, identifiables par la formation d'un précipité rouge, ont été soigneusement remises en suspension dans le tampon phosphate 0,1 M (pH 7) (Defez *et al*., 2017) et ajustées pour atteindre respectivement $3,6 \times 10^5$, $2,5 \times 10^4$, $3,6 \times 10^3$ et $1,2\times 10^3$ cellules viables par ml. Les inoculums bactériens ainsi préparés ont été conservés à 4 °C pour une évaluation ultérieure de leur activité nématicide (Elbanna *et al*., 2011).

b. Préparation de l'inoculum fongique

Après leur identification morphologique et l'élimination des morphotypes répétitifs, les isolats fongiques ont été cultivés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu EMG et incubés

pendant une semaine à 25°C dans l'obscurité. Ensuite, une suspension de conidies a été préparée en inondant les boîtes avec 5 ml d'eau physiologique stérilisée, et en grattant délicatement la surface de l'agar de chaque boite avec des tiges de verre stériles pour récupérer les conidies. Ensuite, les concentrations des conidies ont été ajustées à 10^8, 10^7, 10^6 et 10^5 conidies/ml à l'aide de la cellule de Thoma (Youssef *et al*., 2020). Les inoculums fongiques ainsi préparés ont été conservés à 4 °C pour une évaluation ultérieure de leur activité nématicide.

5. Préparation de l'inoculum du nématode *Tylenchulus semipenetrans*

L'inoculum du nématode (œufs et juvéniles J2) a été préparé à partir de racines d'agrumes infestées (**voir sous-section 2. Chapitre IV**).

6. Criblage sélectif des microorganismes nématicides

Tous les isolats bactériens et fongiques ont subi un criblage sélectif, via des tests de confrontation *in vitro* et *in vivo*, par rapport à leur activité nématicide contre *T. semipenetrans*.

a. Activité nématicide *in vitro*

Pour le test de confrontation *in vitro* impliquant les isolats bactériens ou fongiques, un volume de 1 ml d'une suspension aqueuse de nématodes contenant 50 œufs ou 50 juvéniles J2 de *T. semipenetrans* a été déposé dans une boîte de Pétri stérile d'un diamètre de 3 cm. Chaque boite reçoit un autre volume (1 ml) de l'un des inocula bactériens ($3{,}6 \times 10^5$, $2{,}5 \times 10^4$, $3{,}6 \times 10^3$ et $1{,}2 \times 10^3$ cellules/ml) ou fongiques (10^8, 10^7, 10^6 et 10^5 spores/ml) à tester (inoculation individuelle). Deux traitements combinés (co-inoculation), l'un avec une inoculation mixte des cinq isolats bactériens et l'autre avec une inoculation mixte des trois isolats fongiques, aux mêmes concentrations ont également été utilisés. Les boites témoins contenant les juvéniles ou les œufs de *T. semipenetrans* additionnées de 1 ml du tampon phosphate 0,1 M (pH 7) (témoin bactérien) ou 1 ml d'eau physiologique stérile (témoin fongique) ont servi de témoins. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 25 ± 2 °C pendant une période de 96 heures pour les tests bactériens et 168 h pour les tests fongiques (Ahmad *et al*., 2010). Cinq réplicas ont été fournis pour chaque traitement. Un suivi quotidien du taux de mortalité des J2 a été effectué, tandis qu'un suivi des œufs éclos a été réalisé toutes les 48 heures. Le pourcentage de mortalité de J2 et d'inhibition d'éclosion des œufs a été calculé en utilisant les formules d'Abbott (1925) :

$$\text{Mortalité } (\%) = \frac{(\text{m} - \text{n})}{100 - \text{n}} \times 100$$

$$\text{Inhibition d'eclosion}(\%) = \frac{(\text{Im} - \text{In})}{100 - \text{In}} \times 100$$

Où ; **m** et **n** indiquent la mortalité dans les traitements et le contrôle, respectivement.
Et ; **Im** et **In** représentent les pourcentages d'œufs non éclos dans le traitement et le contrôle respectivement.

b. Activité nématicide *in vivo*

L'expérimentation a été réalisée au niveau de la Faculté des Sciences et Techniques (FST) de Marrakech entre aout et décembre 2022 (24.7- 44.4◦C). Elle avait comme objectif d'évaluer les propriétés nématicides des isolats bactériens et fongiques, seuls ou combinés, contre le nématode des agrumes *T. semipenetrans*. Des plants de portes greffes d'agrumes *Citrange Carrizo* et *Citrus aurantium* âgés de deux ans ont été transplantés individuellement dans des pots en plastique contenant environ 6 kg de substrat stérilisé composé de sable, de tourbe et de sol de texture sablo-limoneuse, faible teneur en Carbone organique, et pH légèrement alcalin (pH 7,42) collecté du domaine Benkaboura (31°35'16.1"N 7°44'11.3"O). À la transplantation, chaque pot a été inoculé avec une population initiale de 500 juvéniles de *T. semipenetrans*. Les pots ont été disposés selon un plan complètement randomisé et régulièrement arrosés. Après une période de 60 jours, des volumes de 20 ml de suspensions bactériennes ($3{,}6 \times 10^5$ cellules viables /ml) ou fongiques (10^8 spores/ml) ont été préparés et ajoutés individuellement à chaque pot. Deux types de témoins ont été utilisés dans cette expérience. Les pots témoins négatifs ont été additionnés des mêmes volumes d'eau physiologique stérile pour les champignons et de tampon phosphate 0,1 M (pH 7) stérile pour les bactéries et les pots témoins positifs ont été exposé à la même population initiale de *T. semipenetrans* sans aucun traitement bactérien ou fongique. Les traitements ont été divisés en dix groupes différents, chacun avec cinq répétitions.

Après trois mois, les plants d'agrumes ont été soigneusement retirés du sol et des échantillons de sol (100 g) et de racines (5g) ont été prélevés de chaque pot pour l'analyse nématologique selon le protocole d'écrit par Flegg and Hooper (1970) et Macaron (1972). L'accroissement (%) des paramètres agronomiques à savoir la longueur relative de la partie aérienne (LPA), la longueur des racines (LR), la masse sèche de la partie aérienne (MSPA) et la masse sèche des racines (MSR) ont été aussi mesurées selon la formule suivante (Khalil and Alqadasi, 2019):

$$\boldsymbol{Acroissement}(\%) = \frac{(\boldsymbol{Traitement} - \boldsymbol{Témoin})}{\textbf{Témoin}} \times \mathbf{100}$$

La réduction (%) des nématodes a été calculée à l'aide de la formule suivante (Abbott, 1925) :

$$\boldsymbol{R\acute{e}duction}(\%) = \frac{\textbf{(Témoin } - \textbf{Traitement)}}{\textbf{Témoin}} \times \textbf{100}$$



Figure 22. Evaluation, in vivo, de l'effet nématicides des isolats bactériens et fongiques contre *T. semipenetrans* chez les porte-greffes d'agrumes *Citrange carrizo* (A) et *Citrus aurantium* (B) cultivés sous serre.

7. Caractérisation moléculaire des isolats bactériens et fongiques ayant une importante activité nématicide

Pour confirmer les résultats des méthodes d'identification classiques, nous avons également procédé à l'identification moléculaire des isolats ayant montré les activités nématicides les plus importantes.

Pour les isolats bactériens, la PCR a été réalisée directement à partir des colonies sans passer par l'extraction d'ADN (Kai *et al*. 2019). L'identification moléculaire des isolats bactériens a été effectuée au sein du laboratoire Africain génomique centre (AGC) de l'Université Mohammed VI Polytechnique de Benguerir.

Pour les isolats fongiques, l'extraction de l'ADN a été effectuée selon le protocole décrit par Doyle and Doyle (1987). Les éléments essentiels du protocole incluent la lyse du mycélium fongique, qui est facilitée par l'introduction d'une bille de verre ou de sable stérile, destinée à aider à la décomposition de la paroi hyphale. Cette étape se déroule en présence du détergent bromure de hexadécyltriméthylammonium (CTAB), qui joue un rôle crucial dans la lyse cellulaire et la libération de l'ADN. Après une période d'incubation dans le tampon

d'isolement, l'ADN est extrait dans la phase aqueuse grâce à un traitement au chloroforme-isoamyl alcool, puis est précipité avec de l'isopropanol. Par la suite, l'ADN précipité est lavé à l'éthanol à 70%, séché à l'air et réhydraté dans un tampon TE pour une utilisation ultérieure. L'identification moléculaire des isolats fongiques a été effectuée au sein de l'Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès.

a. Amplification d'ADN extrait par PCR

i. Amorces utilisées

Pour les bactéries, la PCR consiste à multiplier la séquence du gène de l'ADNr 16S (**Tableau 22**) à l'aide d'amorces spécifiques (PA et 926R) encadrant la séquence de ce gène et générant un amplicon de 1500bp.

Pour l'amplification de l'ADN du champignon, les amorces universelles (**Tableau 22**) amplifiant la région ITS (ITS1 et ITS4) ont été utilisées.

Tableau 22. Séquences d'amorces pour l'amplification d'ADN bactérien et fongique.

	Région	Amorces	Direction	Séquences
Isolats bactériens	16S	PA	Forward	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
		926R	Revers	5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3'
Isolats fongiques	ITS	ITS1	Forward	5'-TCCGTAGGTTATTGATATGC-3'
		ITS4	Revers	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

ii. Mélange réactionnel de la PCR

Les compositions des mélanges réactionnels utilisés pour l'amplification de l'ADN bactérien et fongique sont détaillées sur le **Tableau 23 et 24**.

Tableau 23. Composition du mélange réactionnel pour l'amplification de l'ADN bactérien.

Réactifs (Platinum™ Direct PCR)	Quantité pour 1 tube
Universal Master Mix, 2X	10 µl
Forward Primer (Pa)	0,5 µl
Reverse Primer (926R)	0,5 µl
ADN (100 ng)	0,5 µl
Nuclease-free Water	q.s.p Vt= 20µl
Total	20µl

Tableau 24. Composition du mélange réactionnel pour l'amplification de l'ADN fongique.

DreamTaq Green PCR Master Mix	Quantité pour 1 tube
DreamTaq Green PCR Master Mix, 2X	25 µl
Forward Primer (ITS1)	1µl
Reverse Primer (ITS4)	1 µl

ADN	1µl
Nuclease-free Water	q.s.p Vt= 50µl
Total	50µl

iii. Révélation de l'ADN amplifié par électrophorèse

Les ADN amplifiés par les amorces spécifiques utilisées ont été visualisés par la technique d'électrophorèse et coloration au Bromure d'Ethidium (BET). L'électrophorèse effectuée pour les produits PCR par migration de ces derniers sur un gel d'agarose à 1 % en présence du marqueur de poids moléculaire de 1 Kb. Le gel obtenu après migration est coloré à l'aide du BET (0.02 µg/ml) pendant 25 min, puis rincé à l'eau distillée stérile pendant 10 min, ensuite visualisé par le système de photo documentation ‘’Ibright’’.

iv. Dosage de l'ADN

La qualité et la quantité de l'ADN ont été estimées par dosage au spectrophotomètre Nanodrop 2000c (Biospectrometer) en utilisant les ratios A:260/280 (rapports ADN/Protéines) et A:260/230 (rapports ADN/ARN). Ces ratios sont calculés en divisant l'absorbance mesurée à la longueur d'onde 260 nm par celle mesurée à la longueur d'onde correspondante (280 nm ou 230 nm). Le ratio A:260/280 est souvent utilisé comme indicateur de la pureté de l'ADN, car il permet de déterminer la présence de contaminants tels que les protéines. Un ratio élevé (entre 1,8 et 2,0) indique une pureté élevée de l'ADN, tandis qu'un ratio plus faible peut indiquer la présence de contaminants. Le ratio A:260/230, quant à lui, permet de vérifier la présence de composés organiques tels que les polysaccharides ou les phénols, qui peuvent interférer avec les analyses ultérieures. Un ratio supérieur à 2,0 indique une pureté élevée de l'ADN, tandis qu'un ratio inférieur à 1,8 peut indiquer la présence de contaminants organiques

v. Le séquençage

Tous les produits PCR obtenus avec les différentes étapes détaillées précédemment ont été séquencés par utilisation des mêmes amorces.

vi. Analyses bio-informatiques des séquences nucléotidiques

Les données de séquençage ont été coupées et assemblées à l'aide du programme Geneious Prime 2022.1.1. Les séquences assemblées ont été blastées avec les données génomiques enregistrées dans NCBI (National Centrer for Biotechnology Information) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Certaines séquences nucléotidiques qui sont le résultat du BLAST des espèces les plus proches et des souches types de chaque espèce ont été prises dans les données de la banque de gènes du NCBI. Ensuite, les données ont été analysées

à nouveau avec l'alignements des séquences en utilisant le programme MEGA 11 version 11.0.13 pour l'élaboration de l'arbre phylogénétiques.

8. Cinétique de croissance et activité nématicide des filtrats bactériens et fongiques

Les antagonistes microbiens ayant montré des activités nématicides prometteuses contre le nématode des agrumes *T. semipenetrans* ont été cultivés en trois répétitions dans des erlenmeyers (250 ml) qui contiennent chacun 150 ml de milieu d'isolement pour chaque antagoniste. Les erlenmeyers ont été incubés à 27°C dans l'obscurité pendant 10 jour pour les bactéries et 27 jours pour les champignons. Les suspensions ont été centrifugées à 5000 trs/min pendant 10 min, puis filtrées à travers du papier wattman et des filtres millipore (0,45 et 0,22 µm) dans des conditions aseptiques. Les filtrats ont été testés pour leur activité nématicide en effectuant des prélèvements quotidiens et en les confrontant avec les juvéniles de *Tylenchulus semipenetrans*. Le taux de mortalité journalière a été calculé jusqu'à ce que le maximum de mortalité soit atteint.

9. Isolement, identification morphologique et préparation des inoculums des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA)

a. Isolement et dénombrement des spores des CMA

La méthode de tamisage humide définit par Gerdemann and Nicolson (1963) a été effectuée pour l'extraction des spores de CMA à partir des mêmes échantillons de sol utilisés pour l'isolement des bactéries et des autres champignons. Ainsi une quantité de 100 g de sol a été mise en suspension dans 1 litre d'eau, bien agitée puis laissée décanter pendant 2 heures. Le surnageant a été récupéré et tamisé à travers une série de tamis de mailles décroissantes (500 µm, 250 µm, 63 µm, 45 µm) sous filet d'eau. Cette procédure a été répétée plusieurs fois afin de récupérer le maximum de spores possible. Les spores retenues par les trois derniers tamis ont été récupérées dans des tubes avec de l'eau et centrifugées à 3000 tr/min durant 10 min. Le culot contenant les spores a été récupéré dans une solution de saccharose 68% et centrifugé à 3000 tr/min pendant 15 min. le surnagent a été ensuite filtré sur du papier wattman et les spores ont été observées et dénombrées sous loupe binoculaire. Les spores ont été ensuite conservées à 4 °C pour l'identification.

b. Identification morphologique des souches de CMA

Les spores de CMA isolées de chaque échantillon du sol ont été séparées, selon leurs caractères morphologiques (taille, couleur, forme, taille et ornementation des spores, présence ou absence d'hyphe suspenseur et de bouclier de germination, etc.), en différents morphotypes. Une caractérisation plus poussée des spores de CMA, montées entre lame et lamelle puis colorées au réactif Melzer (Pérez and Schenck 1990; Blaszkowski et al. 2012), a été effectuée à l'aide d'un microscope optique afin d'observer la structure et les principales caractéristiques taxonomiques des parois sporales (le nombre de parois, la présence et le type d'ornementation sur la paroi sporale, la réaction au Melzer, l'épaisseur, etc.). L'identification morphologique a été faite à l'aide d'un microscope en utilisant le « Mycorrhizas in Forestry and Agriculture guidebook » (Merryweather and Moyersoen, 1997) et le site Web de la collection internationale de culture des endomycorhizes arbusculaires (INVAM).

c. Préparation des inoculums des CMA

Deux souches de CMA ont été utilisés dans cette expérimentation, *Rhizophagus irregularis* (C. Walker et A. Schüßler, n° BGCBJ09) et *Funneliformis mosseae* (Gerd. et Trappe, BEG n° 12) multipliées dans notre laboratoire selon les méthodes décrites précédemment (Baslam *et al*., 2014; Fouad *et al*., 2014; Essahibi *et al*., 2019). Les inocula des CMA avaient des caractéristiques infectieuses similaires, avec une infection de racines de 75% et une densité sporale d'environ 20 spores par gramme d'inoculum.

d. Evaluation de la mycorhization naturelle

Le taux de mycorhization est un indicateur de la présence des champignons mycorhiziens à arbuscules dans les racines et donc de la mycorhization naturelles des arbres d'agrumes. Il permet d'estimer le pourcentage des racines endomycorhizées. La fréquence de mycorhization (F%) et l'intensité de colonisation (% M) des racines des agrumes ont été évaluées selon la méthode de Philips et Hayman (1970). Des fragments de racines ont été lavés précautionneusement et coupés à une longueur de 1-2 cm, puis éclaircis avec la potasse 10 % au bain-marie à 90° C durant 20 min. Cette opération détruit le contenu des cellules végétales et décolore les tanins des racines ligneuses. Les racines éclaircies ont été ensuite lavées pour se débarrasser de l'excès de KOH, après elles ont été trompées dans une solution de bleu de Trypan (0,05%) diluée dans du lacto-glycérol (1/3 eau, 1/3 glycérol et 1/3 acide lactique) durant 15 min à 90°C. Les fragments de racines ainsi colorées ont été observés au microscope optique. Les paramètres de mycorhization sont calculés suivant les formules suivantes :

$$\textbf{Fréquence de mycorhization (F\%)} = \frac{(\mathbf{N} - \mathbf{n0})}{\mathbf{N}} \times \mathbf{100}$$

N : Nombre de fragments observés **n0** : Nombre de fragments sans trace de mycorhization

10. Activité nématicide des CMA

L'activité nématicide des CMA a été réalisée comme décrit dans **la section 6, b** de ce chapitre, sauf qu'après une période d'infestation de 60 jours par *T. semipenetrans*, un inoculum (20 g de sol contenant des fragments de racines mycorhizées, des spores et des hyphes du champignon mycorhizien correspondant) a été ajouté à chaque pot. Les plantes (témoins) non inoculées par les CMA ont reçu la même quantité d'inoculum autoclavé.

11. Analyses statistiques

Les données quantitatives ont été exprimées en tant que moyennes d'expériences ± erreur standard. La signifiance des différences entre les moyennes a été testée par analyse de la variance (ANOVA). Le test à plages multiples de Tukey a été réalisés à l'aide du logiciel SPSS (version 25).

III. RÉSULTATS

1. Isolement et screening de l'activité nématicide des isolats

À partir des différents échantillons de sols et de racines d'agrumes collectés des principales régions agrumicoles nationales, un total de 106 bactéries et 127 champignons ont été isolés et purifiés. Dans un premier temps, un screening initial a été réalisé pour caractériser macroscopiquement et microscopiquement les différents isolats fongiques (**voir Annexe IV**) afin de faire l'inventaire des groupes fongiques présents dans les sols et d'éliminer les morphotypes répétitifs. Par la suite, un deuxième screening des isolats a été effectué par l'évaluation de leur activité nématicide contre *T. semipenetrans*, évaluée en termes de réduction de la densité des juvéniles. Ce screening a concerné les morphotypes de champignons non répétitifs résultant du premier dépistage et tous les isolats bactériens (106). Les résultats obtenus à partir des tests de confrontation *in vitro* indiquent que trente isolats bactériens et trente-deux isolats fongiques ont démontré une activité nématicide significative ($p<0,0001$) par rapport au témoin après 72 heures d'incubation a des concentrations de $3,6 \times 10^5$ Cellules/ml pour les bactéries et de 10^8 Spores/ml pour les champignons (**Tableau 25**). Parmi ces isolats bactriens et fongiques testés, cinq isolats bactériens (BR21, B1, B6', BM12, BM7) et trois isolats fongique (BK7, M23, SBK5**)** ont présenté des activités nématicides notables, exprimées en termes d'une réduction significative du nombre des juvéniles. Ainsi, l'étude s'est concentrée

sur ces isolats pour la suite des analyses. L'activité nématicide des isolats fongiques et bactériens varie en fonction de la souche fongique et bactérienne utilisée. En effet, la mortalité des juvéniles J2 de *T. semipenetrans,* après 72h d'incubation, a varié entre 12,03% et 63,12% avec les isolats bactériens BR32 et BM7, respectivement. De même, en présence des isolats fongiques M76 et M23, la mortalité a varié entre 10,31% et 31,64%, respectivement (**Tableau 25**).

Tableau 25. Taux de Mortalité cumulé des juvéniles J2 de *T. semipenetrans* après72h d'incubation a une concentration de 3,6 × 10^5 Cellules/ml pour les bactéries et 10^8 Spores/ml pour les champignons.

Taux de mortalité après 72H			
Isolats fongiques		**Isolats bactériens**	
Témoin	9,34±1,24^{k}	**Témoin**	10,3±1,24^{op}
BK22	12,21±1,75^{ghij}	**BBK6**	30,24±9,27^{ghi}
BK4	15,49±1,28^{fghi}	**BM7**	**63,12±0,91^{a}**
BK12	15,84±1,28^{fghi}	**BBK12**	26,80±5,12^{ijk}
BK51	13,78±0,97^{ghij}	**BB18**	18,21±7,16^{jklmn}
BK34	28,53±2,70^{ab}	**B6'**	**47,81±0 ,78^{cd}**
BK7	**27,55±1,81^{ab}**	**BR32**	12,03±4,93^{nop}
R7	21,99±1,28^{cd}	**BR72**	27,21±0,84^{ijk}
R24	27,56±2,11^{ab}	**BR15**	17,87±9,39^{jklmn}
R23'	12,71±2,95^{ij}	**BR41**	17,53±7,84^{jklmn}
R23	25,84±0,48^{b}	**BR9**	27,90±1,28^{ijk}
R33	11,37±0,84^{ij}	**B1**	**49,49± 2,31^{c}**
R13	17,21±2,95^{ef}	**BM23**	33,09±1,68^{efg}
R37	18,93±1,28^{def}	**BM43**	21,00±2,12^{jklm}
R10	11,39±4,15^{ij}	**BM8**	31,68±2,11^{fgh}
M43	18,59±2,57^{def}	**BM6**	15,12±4,31^{mno}
M23	**31,63±1,28^{a}**	**BM28**	20,65±3,79^{jklm}
M12	15,80±0,84^{fghi}	**BM1**	14,78±4,63^{mno}
M9	17,52±2,11^{ef}	**BM87**	16,15±4,15^{klmn}
M52	16,83±0,97^{efg}	**BM12**	**51,51±1,51^{b}**
M45	17,18±1,28^{ef}	**BR21**	**36,70±1,67^{e}**
M21	13,74±3,36^{ghij}	**BS91**	31,68±4,93^{fgh}
M76	10,31±3,50^{ij}	**BS43**	21,65±4,31^{jklm}
S5	16,86±2,70^{efg}	**BS13**	22,37±3,66^{jklm}
S12	22,34±1,28^{c}	**BS22**	26,87±1,75^{ijk}
S23	18,90±1,75^{def}	**BS6**	26,84±1,28^{ijk}
S11	18,90±1,28^{def}	**BS11**	19,93±1,28^{jklmn}
S26	24,05±2,11^{bc}	**BN6**	24,40±1,75^{jkl}
S3	17,87±3,97^{ef}	**BN13**	30,58±1,28^{ghi}
SBK5	**25,18±1,54^{b}**	**BN81**	26,80±5,89^{ijk}
BN17	20,27±2,11^{cd}	**BN43**	21, 32±2,31^{jklm}

BN2	26,12±1,28^{b}	-
BN10	18,21±1,68^{def}	-

Les moyennes suivies par des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

2. Caractérisation des isolats bactériens ayant une activité nématicide

a. Caractéristiques morphologiques, microscopiques et biochimiques des isolats bactériens à activité nématicide

Les caractéristiques morphologiques culturelles, microscopiques et biochimiques des bactéries à activité nématicides sont rassemblées dans le **Tableau 26.** La majorité de ces bactéries nématicides sont des bacilles à Gram positif, capsulés, en forme de bâtonnets, groupés en paires et en chaînes, constituant des endospores, et manifestant des réactions positives aux différents tests biochimiques effectués. En outre, ces bactéries ont été capables de se développer à une large gamme de température, entre 4 °C et 50 °C, et une large gamme de pH, de 4 à 9, ainsi qu'à des concentrations de NaCl allant jusqu'à 5. L'isolat B1 qui est identifié comme étant *Bacillus sp.*, est une bactérie à Gram positive, en forme de bacilles simples ou appariées. Sa température de croissance est comprise entre 25°C et 45°C, avec un optimum à 37°C. Il peut pousser en milieu supplémenté par des concentrations élevées en NaCl allant jusqu'à 5‰ (masse/volume). Il tolère un pH de 7 et il manifeste des réactions positives aux tests de la catalase et oxydase.

Les capacités des isolats bactériens sélectionnés de promouvoir la croissance des plantes, en particulier leur aptitude à synthétiser des auxines et à solubiliser du phosphate et du potassium sont représentées dans le **Tableau 26**. Les cinq bactéries isolées de la rhizosphère des agrumes ((B6'), (B1), (BM12), (BM7), (BR21)) (**Annexe V**) ont été évaluées pour leurs traits PGPR, lesquels ont révélé des variations significatives ($p < 0,05$). Tous les isolats ont montré une capacité à produire de l'auxine et à solubiliser le phosphate, sans pour autant solubiliser le potassium. L'isolat B6' s'est distingué en solubilisant plus de phosphore (885,01µg/l) parmi toutes les bactéries étudiées, suivie des isolats BR21, *BM12*, *B1*, *BM7*et. Quant à la production d'acide indole-3-acétique (AIA), l'isolat B1 a été le plus performant, alors que l'isolat BR21 a montré une production d'AIA relativement faible.

Tableau 26. Caractéristiques morphologiques culturaux, microscopiques et biochimiques des isolats bactériens à activité nématicide contre *T. semipenetrans*.

	Bactérie à activité nématicide			
B6'	**B1**	**BM7**	**BM12**	**BR21**

Type de Gram	-	+	+	+	+
Endospore	-	+	+	+	-
Mobilité	+	-	+	+	-
Pigmentation	+	-	+	+	+
Croissance à Température					
65 °C	-	-	-	-	-
45 °C	+	+	+	+	-
37 °C	+	+	+	+	+
25 °C	+	+	+	+	+
4 °C	-	-	-	-	-
Croissance à pH					
3	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	+
Croissance en NaCl (‰)					
5	+	+	+	+	+
65	-	-	-	-	+
200	-	-	-	-	-
Caractéristiques biochimiques					
Oxydase	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Production d'auxine (µg/ml)	65,74±8,57b	94,38±5,40a	60,43±6,41b	54,44±9,73b	30,33± 3,83c
Solubilisation de phosphate (µg/l)	885,01± 14,69a	417,74±4,67e	361,09±5,51d	774,38±14,73c	815,02±13,87b
Solubilisation de potassium	-	-	-	-	-
	-	***Bacillus sp***.	***Bacillus sp.***	***Bacillus sp***.	-

Les moyennes suivies par des lettres différentes dans la même ligne sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

3. Identification morphologique des isolats fongiques à activité nématicide

Les caractéristiques macro et microscopiques des isolats fongiques à activité nématicide sont rassemblées dans le **Tableau 27**.

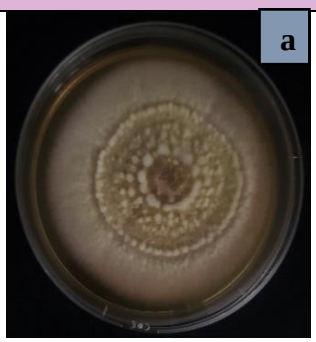
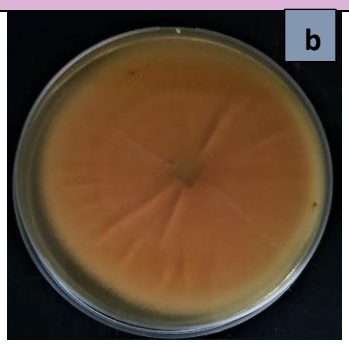
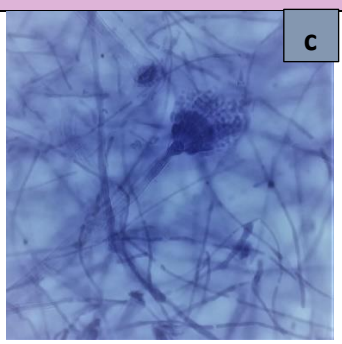
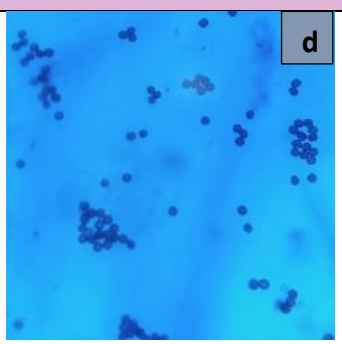
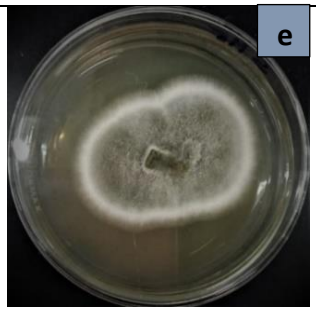
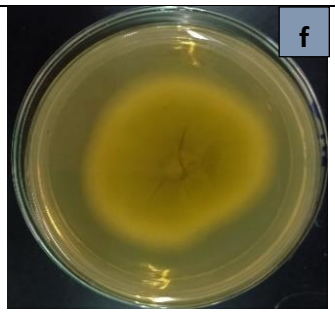
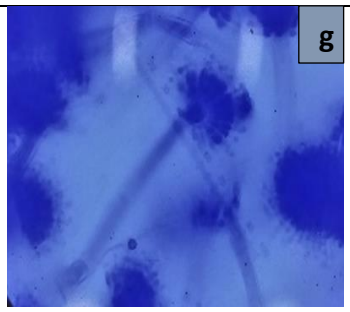
L'isolat SBK5 (**Tableau 27, a et b**) est caractérisé par un thalle à croissance rapide (3.2 cm/jour), à mycélium blanc jaunâtre avec des pigments jaune-claires, des têtes conidiennes bisériées, globuleuses, conidiophores hyalins de 2 à 3 mm, et des conidies globuleuses de 2 à 3 µm de diamètre (**Tableau 27, d**). D'après ces caractéristiques l'isolat SBK5 est identifié en tant que ***Aspergillus terreus.***

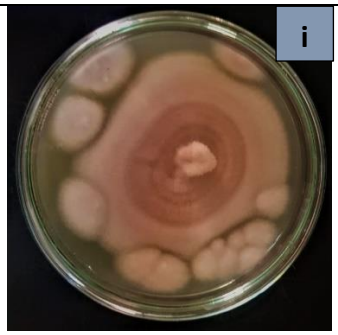
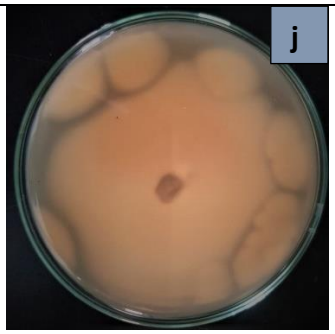
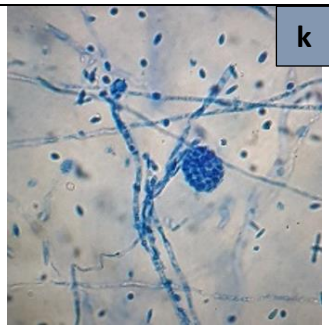
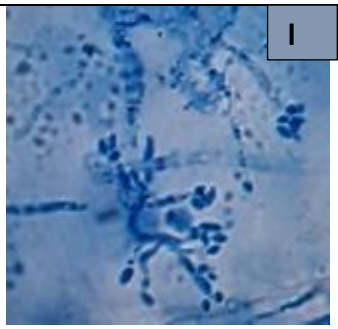
L'isolat M23 (**Tableau 27, e et f**) est caractérisé par un thalle à croissance modérée (2.3 cm/jour), plus au moins cotonneux à revers jaune, à mycélium gris

brun a brun olive avec des pigments jaunes foncés, des conidiophores sinueux de 400 µm, et des conidies sphériques et globuleuses de 3 à 4 µm de diamètre (**Tableau 27, h**). D'après ces caractéristiques l'isolat M23 est identifié en tant que ***Aspergilus ustus.***

L'isolat BK7 (**Tableau 27, i et j**) est caractérisé par un thalle velouté, poudreux, à croissance rapide (3.4 cm/jour), une structure sporifères simples ou agrégées constitué de conidiophores ramifiés portant des phialides solitaires ou en groupe de 10 à 12 µm de long et des conidies subglobuleuses a ellipsoïdales de 4 à 5 µm de diamètre (**Tableau 27, l**). D'après ces caractéristiques l'isolat BK7 est identifié en tant que ***Paecilomyces lilacinus.***

Tableau 27. Caractéristiques macro et microscopiques des isolats fongiques à activité nématicide.

	Caractéristiques macroscopiques		Caractéristiques microscopiques		
SBK5					***Aspergillus terreus***
M23					***Aspergilus ustus***

BK7	 i	 j	 k	 l	*Paecilomyces lilacinus*

4. Caractérisation moléculaire des antagonistes bactériens et fongiques

Après l'évaluation de l'activité nématicide des différentes bactéries et champignons isolées, et leur caractérisation biochimique et culturelle, nous avons procédé à l'identification moléculaire des isolats bactériens et fongiques ayant exhibé une activité nématicide prometteuse. Le dosage de la quantité et de la qualité de l'ADN en utilisant les ratios A:260/280 (rapports ADN/Protéines) et A:260/230 (rapports ADN/ARN) (**Figure 22**) sont consolidés dans le **Tableau 28.**

Les résultats obtenus ont révélé que l'isolat BR21 a donné la plus grande quantité d'ADN, avec une valeur de 376,2 ng/µl, suivi de l'isolat M12 avec 316 ng/µl. L'isolat B1 a montré la plus faible quantité d'ADN, soit une valeur de 119,1 ng/µl. En ce qui concerne la pureté de l'ADN, tous les échantillons ont présenté des valeurs acceptables de rapport A260/A280, variant de 1,48 à 1,79, indiquant une pureté adéquate de l'ADN extrait. Les résultats de l'amplification de la séquence du gène de l'ADNr 16S des isolats bactériens sont présentés dans la **Figure 24.**

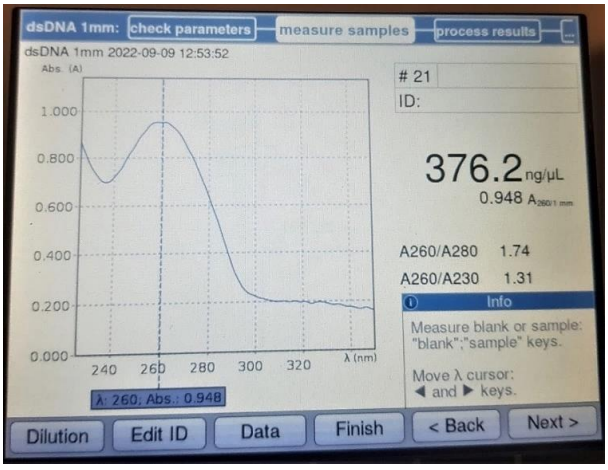


Figure 23. Quantification de l'ADN bactérien à l'aide des ratios A:260/280 et A:260/230.

Tableau 28. Détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN extrait de chaque isolat bactérien en utilisant les ratios 260/280 (ADN/Protéines) et 260/230 (ADN/ARN).

Isolats bactériens	Quantité ng/µl	A260/A280	A260/A230
B6'	301,6	1,48	0,70
B1	119,1	1,79	1,44
BM12	316	1,52	0,75
M7	175,4	1,79	1,02
BR21	376,2	1,74	1,31

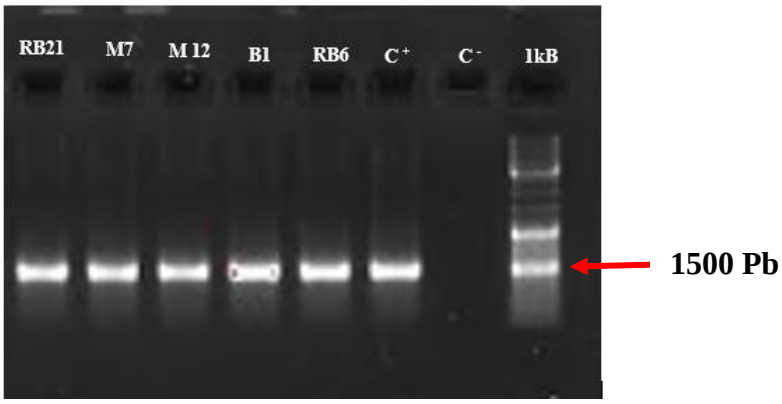


Figure 24. Amplification du gène ADNr 16S des différents isolats bactériens.

Les isolats antagonistes ont été identifiés par séquençage du gène de l'ADNr 16S pour les espèces bactériennes et par séquençage de la région ITS pour les espèces fongiques. Les différentes séquences acquises ont ensuite été soumises à une recherche BLAST dans la base des données NCBI avant d'être déposées dans la banque des gènes sous leurs numéros d'accession : OQ651063 OQ652044 , OQ651985 , OQ651999, OQ659014, OR250916 et OR250163 pour *Variovorax paradoxus, Bacillus pseudomycoides, Bacillus simplex, Bacillus cereus* et *Paracoccus speluncae, Aspergillus terreus et Aspergillus ustus*, respectivement. Les données du **Tableau 29** présentent les résultats des analyses BLAST de NCBI des isolats bactériens et fongiques ayant montré une activité nématicide. Selon l'arbre phylogénétique (**Figure 25**), l'isolat B6' a été identifié comme étant *Variovorax paradoxus*, la comparaison nucléotidique de la séquence du gène de l'ADNr 16S et d'autres souches similaires provenant du NCBI a révélé que notre souche de *Variovorax paradoxus* présente 99.42% de similarité avec *Variovorax paradoxus* KP686135, et *Variovorax paradoxus* OP986254. L'isolat B1 a été identifié comme étant *Bacillus pseudomycoide* et présente une similarité de 99,64 % avec *Bacillus pseudomycoide* MT071726 et *Bacillus pseudomycoide* MK616817. L'isolat BM12 a été identifié comme étant *Bacillus simplex* et présente une similarité de 99,42 % avec *Bacillus simplex* MF977326, *Bacillus simplex* MN559451 et *Bacillus simplex* KY323321. L'isolat BM7 a été identifié comme étant *Bacillus cereus* et présente une similarité de 99,06 % avec *Bacillus*

cereus MF972895, *Bacillus cereus* MK640804 et *Bacillus cereus* KP729612. L'isolat BR21 a été identifié comme étant *Paracoccus speluncae* et présente une similarité de 99,06 % avec NR149253 et *Paracoccus speluncae* MN816899. Selon l'arbre phylogénétique (**Figure 26**), l'isolat SBK5 a été identifié comme étant *Aspergillus terreus* OR250916 et présente une similarité de 97,57% avec *Aspergillus terreus* ON231660 et *Aspergillus terreus* ON231659. Et enfin l'isolat M23 a été identifié comme étant *Aspergillus ustus* OR250163 et présente une similarité de 97,33% avec *Aspergillus ustus* MH559498 *et Aspergillus ustus* MH865327.

Tableau 29. Origine et localisation géographique ainsi que le numéro d'accession GenBank des isolats identifiés.

	Espèces identifiées	% d'identité	Numéro d'accession GenBank	Origines géographique	Coordonnées
B6'	*Variovorax paradoxus*	99,42%	OQ651063		
B1	*Bacillus pseudomycoides*	99,64%	OQ652044	Berkane	34°58'19.2"N 2°22'47.4"W
BR21	*Paracoccus speluncae*	99,63%	OQ659014		
BM7	*Bacillus cereus*	99,06%	OQ651999	Marrakech-Safi	31°36'59.9"N 8°07'07.9"W
BM12	*Bacillus simplex*	99,42%	OQ651985		
SBK5	*Aspergillus terreus*	97,57%	OR250916	Souss-Massa	30°02'35.7"N 9°33'21.6"W
M23	*Aspergilus ustus*	97,33%	OR250163	Marrakech-Safi	31°36'59.9"N 8°07'07.9"W

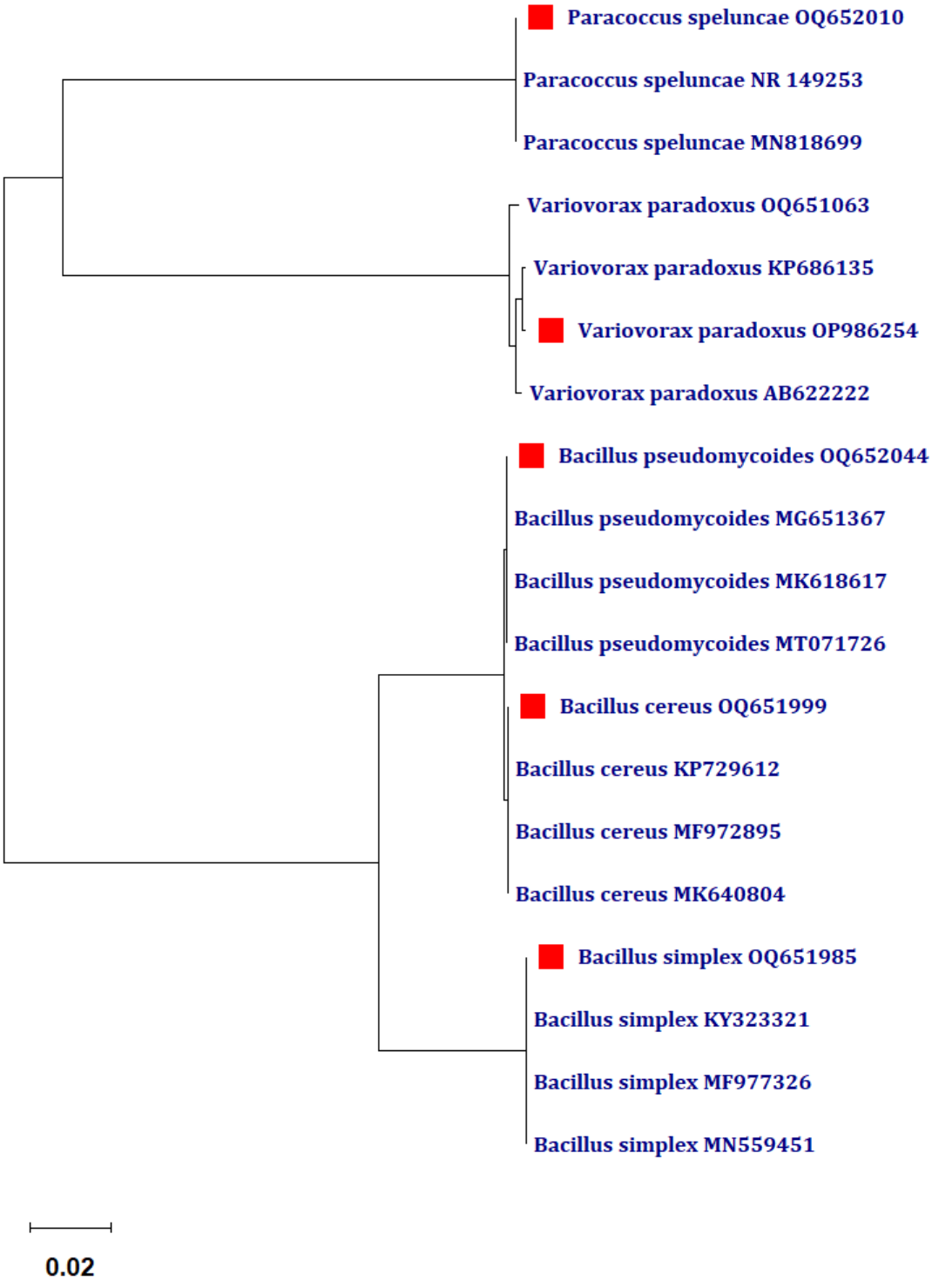


Figure 25. Arbre phylogénétique obtenue par l'analyse des séquences nucléotidiques de la région 16S d'ADNr de *Variovorax paradoxus* **OQ651063**, *Bacillus pseudomycoides* **OQ652044**, *Bacillus simplex* **OQ651985**, *Bacillus cereus* **OQ651999** et *Paracoccus speluncae* **OQ659014**.

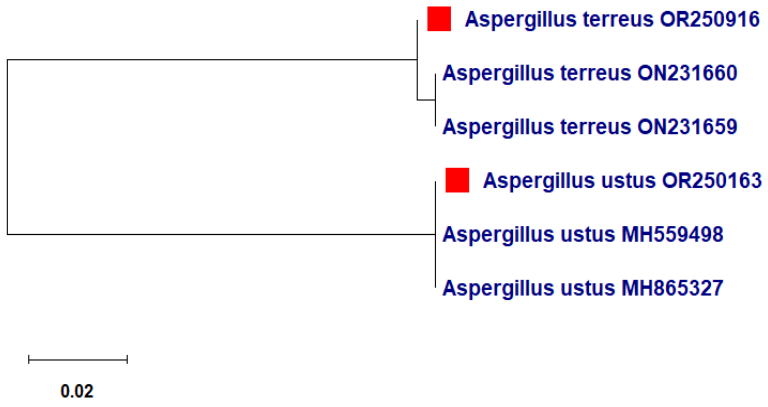


Figure 26. Arbre phylogénétique obtenue par l'analyse des séquences nucléotidiques de la région ITS d'ADNr 18S d'*Aspergillus terreus* **OR250916** et d'*Aspergilus ustus* **OR250163**.

5. Effet de la concentration des isolats fongiques et bactériens et du temps d'incubation sur leur activité nématicide in vitro

a. Effet des bactéries sur la mortalité des juvéniles

Les résultats du criblage *in vitro*, basé sur l'activité nématicide contre *T. semipenetrans*, de 106 isolats bactériens ont montré qu'une trentaine d'isolats bactériens ont manifesté une activité nématicide (**Tableau 25, section 1 de ce chapitre)** dont cinq, (*V. paradoxus* (**OQ651063**) (B6'), *B. pseudomycoides* (**OQ652044**) (B1), *B. simplex* (**OQ651985**) (BM12), *B cereus* (**OQ651999**) (BM7) et *P. speluncae* (**OQ652010**) (BR21)) possèdent un pouvoir nématicide très élevé (**figure 27 a, b, c, d)**. En effet, les 5 isolats ont provoqué une mortalité significative chez les J2 de *T. semipenetrans* ($p < 0,0001$). L'activité nématicide des isolats bactériens augmente significativement avec l'augmentation de leurs concentrations ($p < 0,001$) et de la durée d'incubation ($p < 0,001$). En effet, au cours des premières heures d'incubation, la majorité des bactéries ont été faiblement actives sur les J2 de *T. semipenetrans* quelle que soit leurs concentrations. En revanche, après 96 heures d'incubation, une importante activité nématicide a été observée et le taux de mortalité des J2 a significativement varié avec la souche bactérienne ($p < 0,05$) et sa concentration ($p < 0,001$). En effet, le taux de mortalité le plus élevé a été enregistré avec le traitement combiné (co-inoculation) des cinq bactéries (100% de mortalité) et avec la bactérie *B. cereus* (98.98%) après 96 h d'incubation à la concentration $3,6 \times 10^5$ (Cellules/ml) (**figure 27 a**). Les bactéries *V. paradoxus* et *B. pseudomycoides* ont entraîné les pourcentages de mortalité le plus faibles 58.58% et 65.99%, respectivement à la même durée d'incubation (96h) et la même concentration ($3,6 \times 10^5$ Cellules/ml). Par ailleurs, en présence d'une faible concentration bactérienne ($1,2 \times 10^3$ Cellules/ml), l'activité nématicide a été

significativement plus faible (**figure 27 d**). En effet, le taux de mortalité des J2 après 96 heures d'incubation n'a été que de 51,85% chez le traitement combiné et de 46,42% chez *B. cereus*, soit une mortalité respectivement 2 fois et de 2,13 fois inférieure par rapport aux taux de mortalité enregistrés à la même durée d'incubation (96 h) mais à une concentration plus élevée ($3,6 \times 10^5$ Cellules/ml).

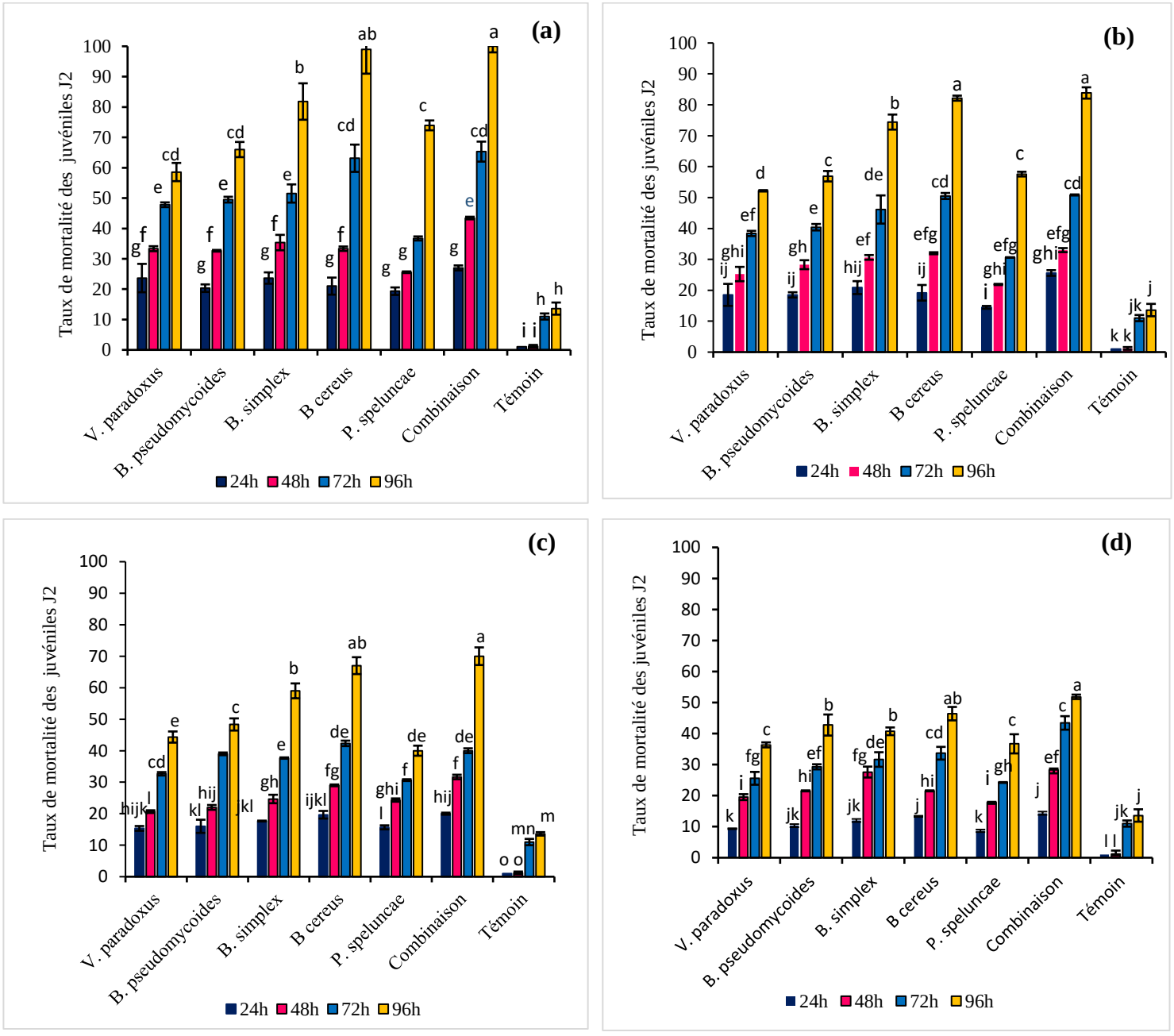
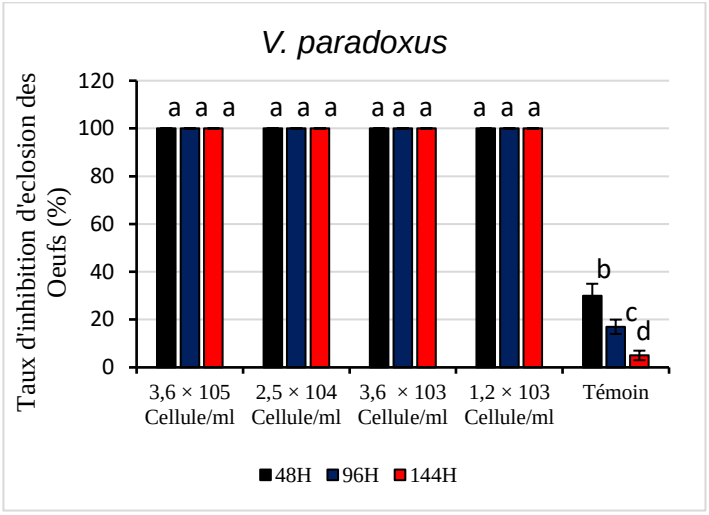
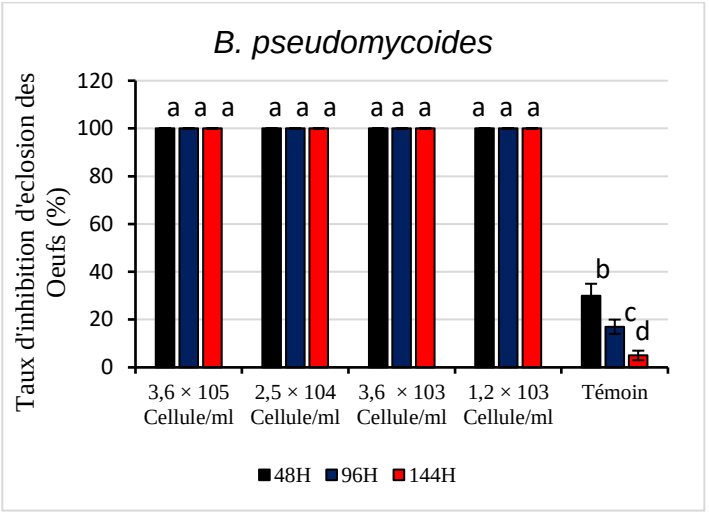


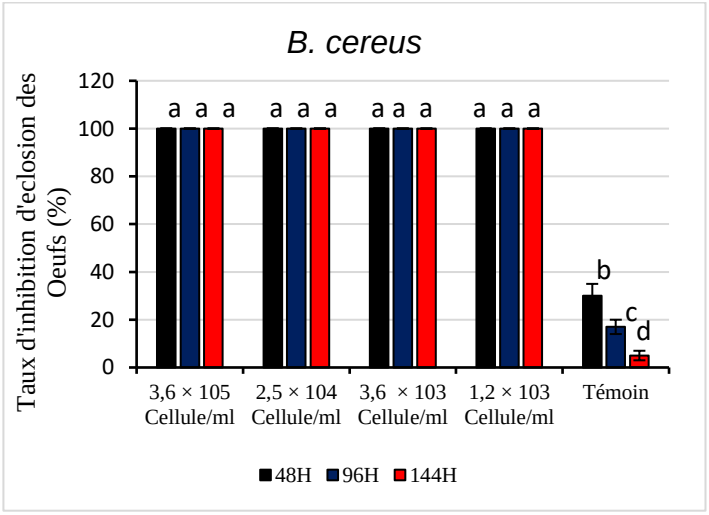
Figure 27. Taux de Mortalité cumulé des juvéniles J2 de *T. semipenetrans* après 24h, 48h, 72h et 96h heures d'incubation in vitro à différentes concentrations bactériennes, $3,6 \times 10^5$ (a), $2,5 \times 10^4$ (b), $3,6 \times 10^3$ (c) et $1,2 \times 10^3$ (d) (Cellules/ml). Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

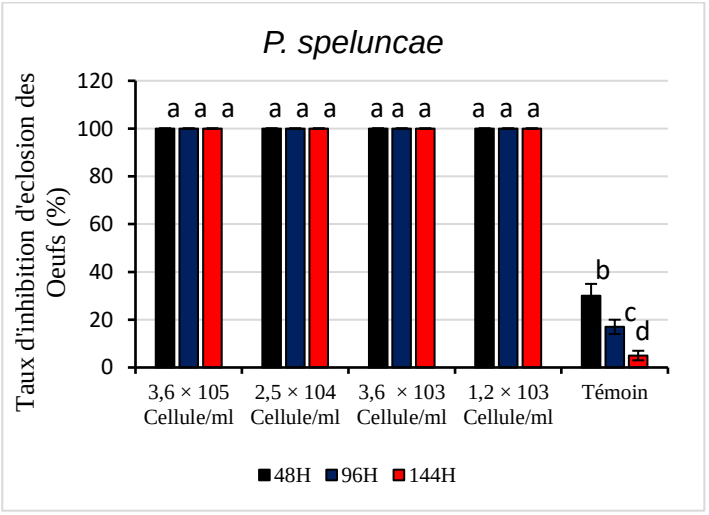
b. Effet des bactéries sur l'éclosion des Œufs

Les résultats ont montré que tous les traitements ont entraîné une inhibition complète de l'éclosion des œufs de *T. semipenetrans* (**Figure 28**). Ces résultats sont nettement visibles sous microscope. En effet, Après 96 heures de traitement avec *V. paradoxus* (**OQ651063**) et *B. pseudomycoides* (**OQ652044**) on observe la présence d'œufs morts ou non viables (colorés foncé) (**Tableau 30, A et B**). En revanche, le traitement avec *B. cereus* (**OQ651999**), conduit à la mort des œufs embryonnés et des nématodes prêts à éclore (**Tableau 30, D**), tandis que l'application de *P. speluncae* (**OQ652010**) et de *B. simplex* (**OQ651985**) entraîne la mort et la dégradation des œufs embryonnés et des nématodes prêts à éclore (**Tableau 30, E**). Ces observations diffèrent nettement de celles faites dans le groupe témoin (Milieu LB), où l'on observe une mortalité très faible voire nulle, ainsi qu'une forte éclosion des œufs qui présentent un contenu embryonnaire non coloré (**Tableau 30, F**).









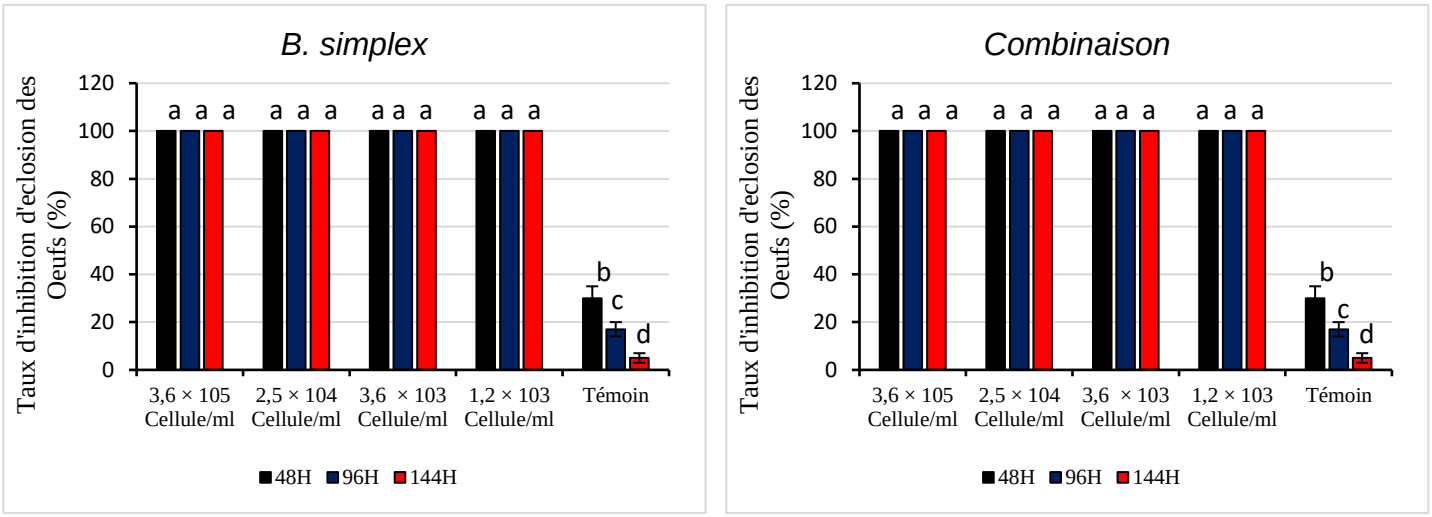
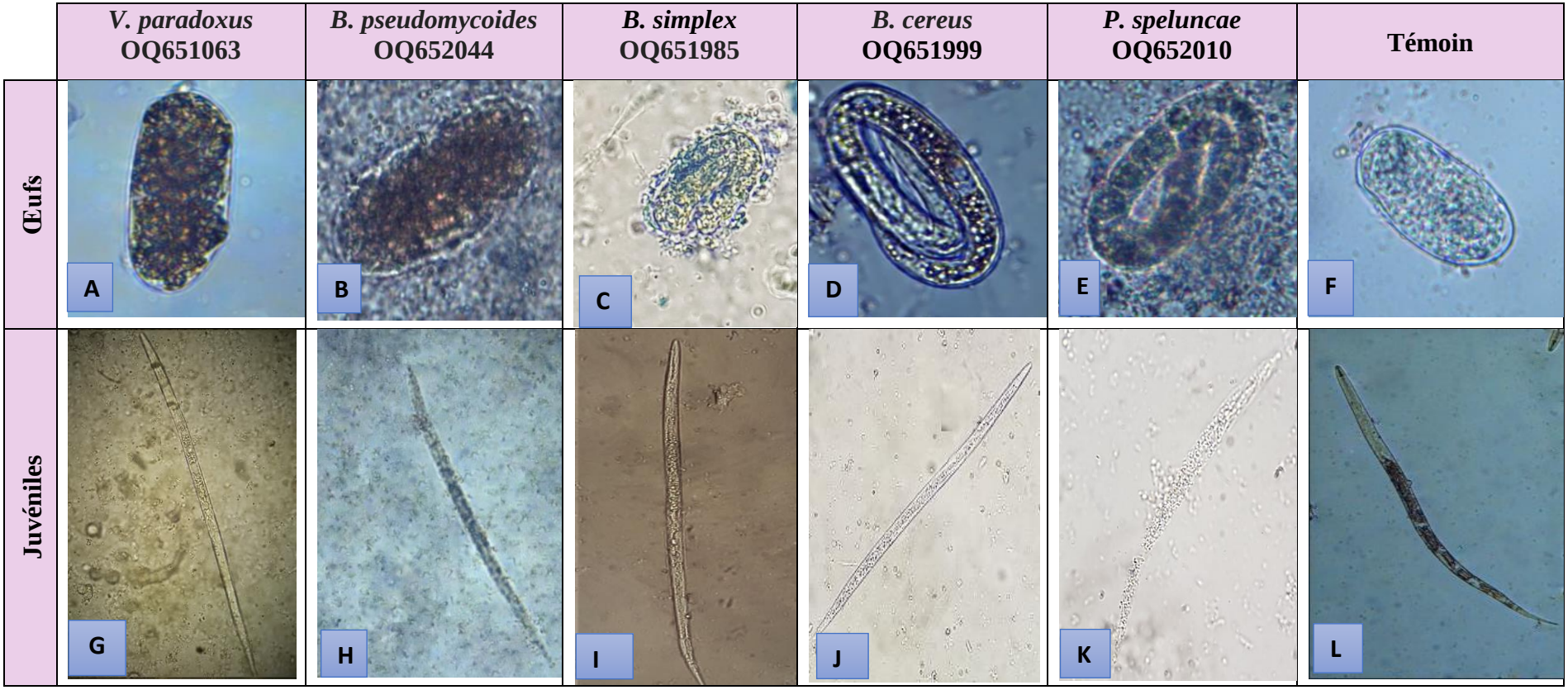


Figure 28. Taux d'inhibition d'éclosion des œufs de *T. semipenetrans* après 48H, 96H et 144H de traitement avec différents isolats bactériens, *V. paradoxus* et *B. pseudomycoides*, *B. cereus*, *P. speluncae*, *B. simplex*, ou avec le traitement combiné (inoculation mixte des 5 isolats bactériens) à des concentrations de $3,6 \times 10^5$, $2,5 \times 10^4$, $3,6 \times 10^3$ et $1,2 \times 10^3$ Cellules/ml. Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

Tableau 30. Aspect des œufs et des juvéniles de *T. semipenetrans* observés sous un microscope optique à 400X. A-B : œufs embryonnés colorés foncés (non viables) et non dégradés ; C: œuf non viable et dégradé ; D : œuf prêt à éclore mort ou non viable; E : œuf prêt à éclore coloré et dégradé ; F : œuf viable (clair) non coloré embryonné (Témoin) ; G, H, I, J, K : juvéniles non viables ; L: juvénile non traité (Témoin).



c. Effet des isolats fongiques sur la mortalité des juvéniles J2 de *T. semipenetrans*

Les résultats du criblage sélectif *in vitro,* basé sur l'activité nématicide contre *T. semipenetrans,* menée sur 84 isolats fongiques (identifiés morphologiquement et sélectionnés pour leur non-répétitivité) ont montré que parmi les 84 isolats fongiques testés, 32 ont démontré une activité nématicide dont trois, *A. terreus* **(OR250916)**, *A. ustus* **(OR250163)**, et *P. lilacinus* possèdent une activité nématicide particulièrement élevée contre *T. semipenetrans*. Les analyses statistiques ont révélé une variation significative de l'activité nématicide en fonction de la souche fongique ($P<0.05$), de la concentration en conidies ($P<0.001$), de la durée d'incubation ($P<0.001$) et du stade de développement du nématode ($P<0.0001$).

En présence de faible concentration fongique (10^5 spores/ml), la mortalité des juvéniles J2 de *T. semipenetrans,* après 24h d'incubation, a été assez faible et a varié entre 6,06% pour le traitement par *A. ustus* et 8,42% pour le traitement par *P. lilacinus* **(Figure 29, d)**. L'activité nématicide des différents isolats fongiques a augmenté avec l'augmentation de la concentration fongique et de la durée d'incubation, atteignant plus de 93% pour *A. terreus* et *P. lilacinus* à la concentration la plus élevée (10^8 spores/ml) après 168h d'incubation **(Figure 29, a)**.

Comparé à l'inoculation individuelle, le traitement par la combinaison des souches fongiques a entraîné des taux de mortalité plus faibles, notamment à des courtes périodes d'incubation, soit 9,33%, 32,99% et 70,98% obtenus avec la concentration fongique la plus élevée (10^8 spores/ml) après respectivement 24h, 96h et 168h d'incubation **(Figure 29, a)**.

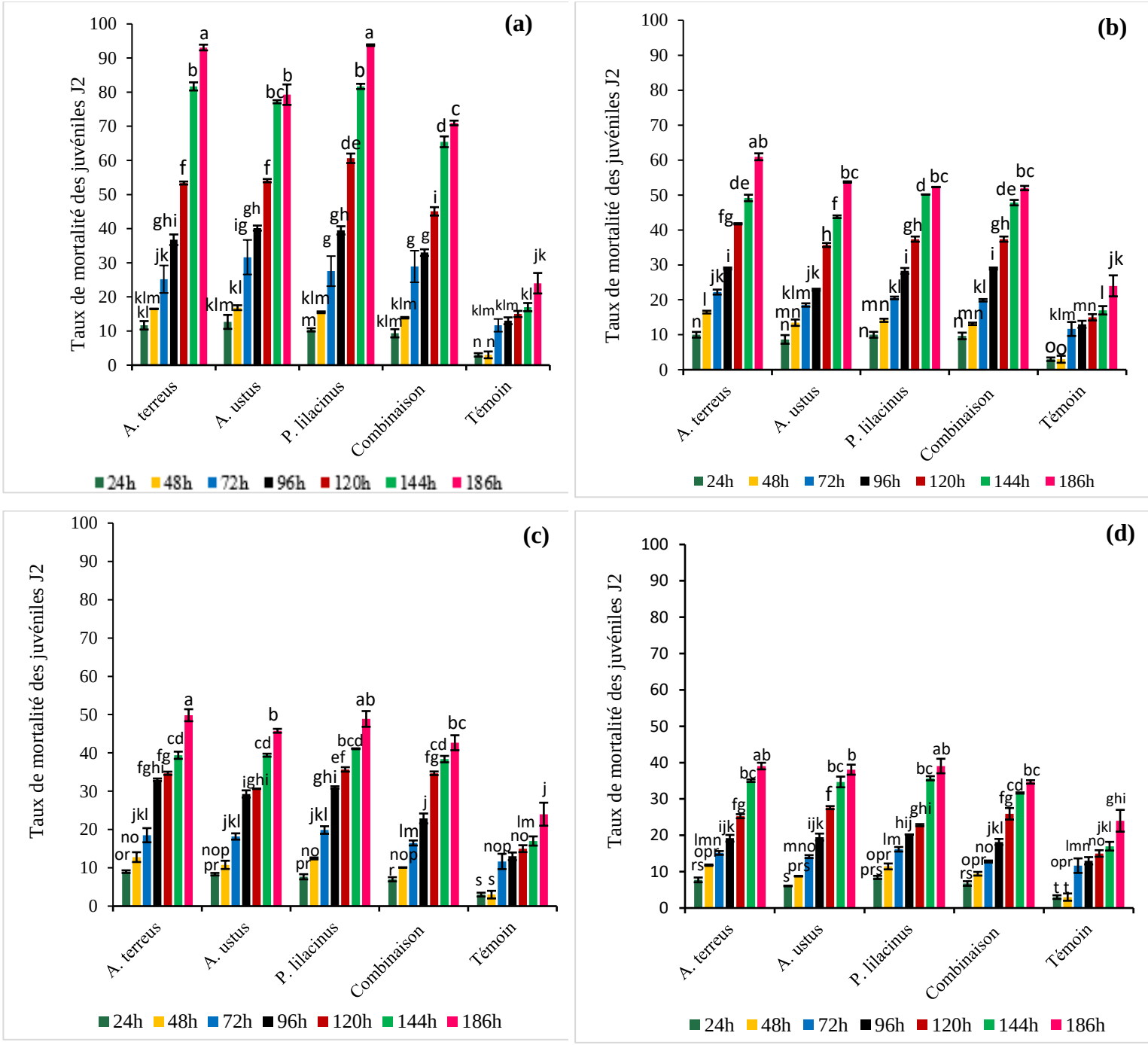


Figure 29. Taux de Mortalité cumulé des juvéniles J2 de *Tylenchulus semipenetrans* après 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h et 168h d'incubation in vitro en présence de suspension sporale fongique de *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, *Paecilomyces lilacinus*, ou du traitement combiné (suspension mixte des trois isolats fongiques à des concentrations de 10^8 (a), 10^7 (b), 10^6 (c) et 10^5 (d) Spores/ml. Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

d. Effet des isolats fongiques sur l'éclosion des œufs

Les résultats de la **Figure 30** montrent que les différents isolats fongiques testés ont réduit significativement ($P<0,001$) l'éclosion des œufs de T. *semipenetrans*. En effet, une

inhibition totale d'éclosion des œufs a été provoquée par tous les isolats fongiques aux concentrations de 10^8, 10^7 et 10^6 spores/ml, et ce indépendamment de la durée d'incubation. Tandis qu'une faible éclosion a été enregistrée à la concentration de 10^5 spores/ml. En effet, *P. lilacinus* et la combinaison des trois champignions ont causé les pourcentages d'inhibition d'éclosion des œufs le plus élevé (>85%) après 144 h d'incubation, suivi de *A. ustus* (82,66%) et de *A. terreus* (75,66%). Ces résultats sont nettement visibles sous microscope, car après 144 heures de traitement avec *A. terreus*, *P. lilacinus* et *A. ustus* on observe la présence d'œufs morts ou non viables (colorés foncé) (**Tableau 31, A, B et C**). Ces observations diffèrent nettement de celles faites chez le témoin (milieu EM), où l'on observe un contenu embryonnaire non coloré (**Tableau 31, D**).

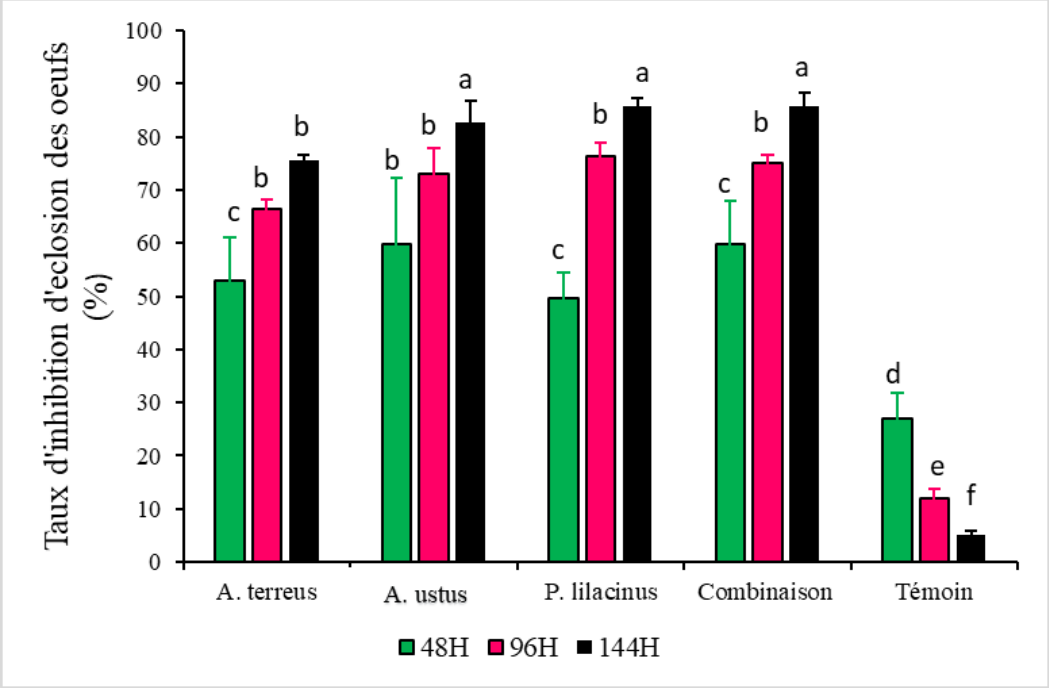
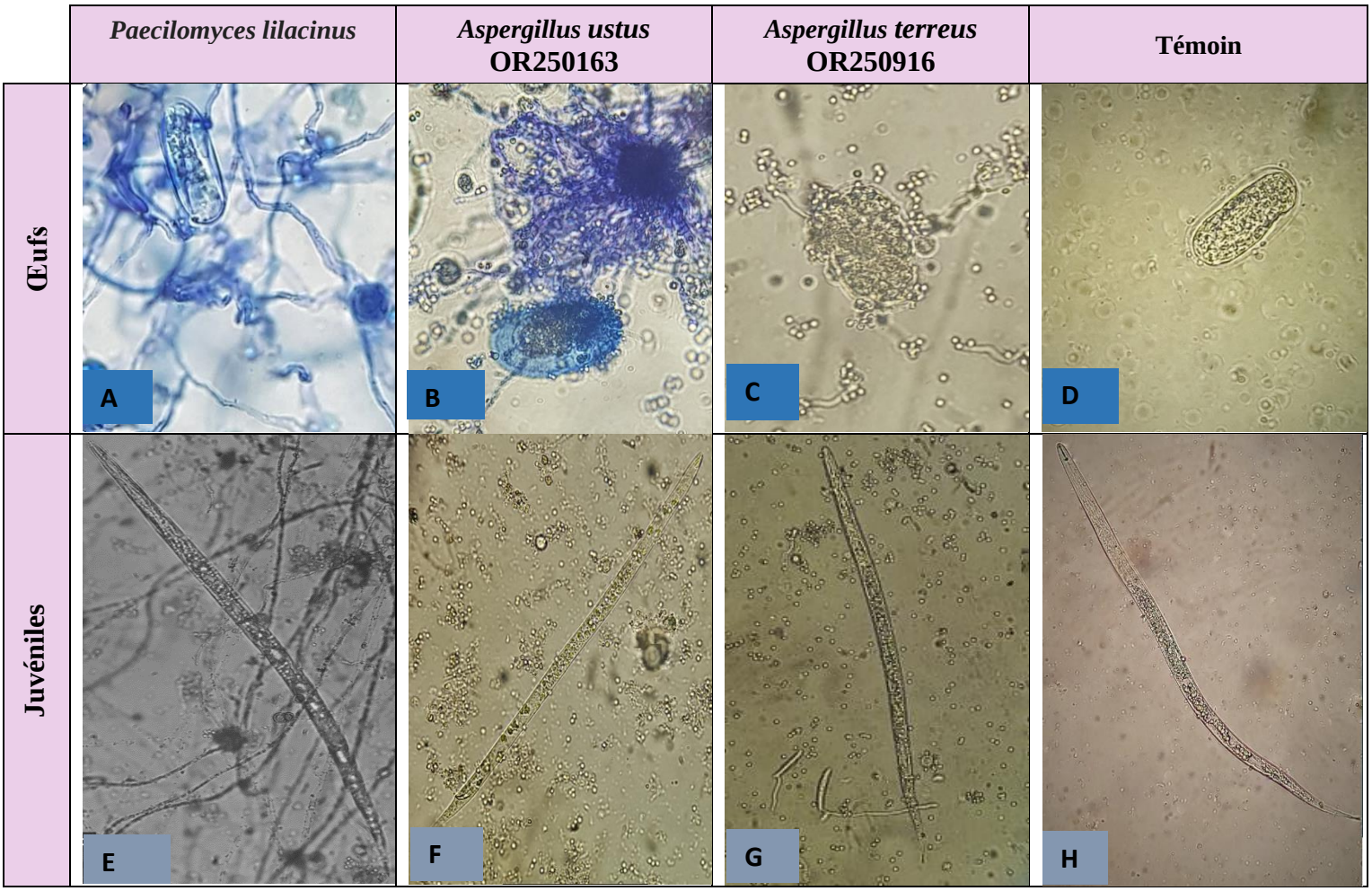


Figure 30. Taux d'inhibition d'éclosion des œufs de *T. semipenetrans* après 48h, 96h et 144h d'incubation in vitro en présence de suspension sporale fongique de *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, *Paecilomyces lilacinus*, ou du traitement combiné (suspension mixte des trois isolats fongiques) à la concentration de 10^5 spores/ml. Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

Tableau 31. Aspect des œufs et des juvéniles de *T. semipenetrans* observés sous microscope optique à 400X après traitement par les suspensions sporales fongiques. A, B : œufs embryonnés, colorés foncés (non viables) et non dégradés entourés par les spores de l'antagoniste fongique ; C: œuf embryonné, coloré foncé (non viable) et lysé; D : œuf viable non coloré (clair) embryonné (témoin) ; E, F, G : juvéniles non viables ; H : juvénile non traité (témoin).



6. Activité nématicide in vivo

a. Effet des isolats bactériens sur les paramètres phytonématologiques

Les résultats de l'étude *in vivo* ont montré que tous les agents bactériens testés, *V. paradoxus* (**OQ651063**), *B. pseudomycoides* (**OQ652044**), *B. simplex* (**OQ651985**), *B cereus* (**OQ651999**), *P. speluncae* (**OQ652010**) et leur combinaison ont provoqué une réduction significative des populations de *T. semipenetrans* aussi bien dans le sol rhizosphériques (P<0,001) que dans les racines (P<0,001) chez les deux variétés porte-greffes d'agrumes, *Citrus aurantium* et *Citrange Carrizo*, soient des taux de réduction respectifs de plus de 84% et de 62%. L'activité nématicide contre *T. semipenetrans* a significativement varié en fonction des isolats bactériens (p <0,001) et du porte-greffe d'agrumes (p <0,001). En effet, les taux de

réduction des populations de nématodes dans le sol rhizosphérique ont varié entre 94,89% en présence de *B. cereus* et 84,85% en présence de *V. paradoxus* chez le *Citrus aurantium* et entre 94,79% et 86,98% chez *Citrange Carrizo* inoculés avec *B. simplex* et *V. paradoxus* respectivement (**Figure 31 a, c**). Cependant, dans les racines, le pourcentage de réduction le plus élevé (96,30%) a été induit par *P. speluncae* et *B. simplex* chez *Citrange Carrizo*, et par *B. cereus* et la combinaison des cinq bactéries (90,77%) chez *Citrus aurantium* (**Figure 31 b, d**).

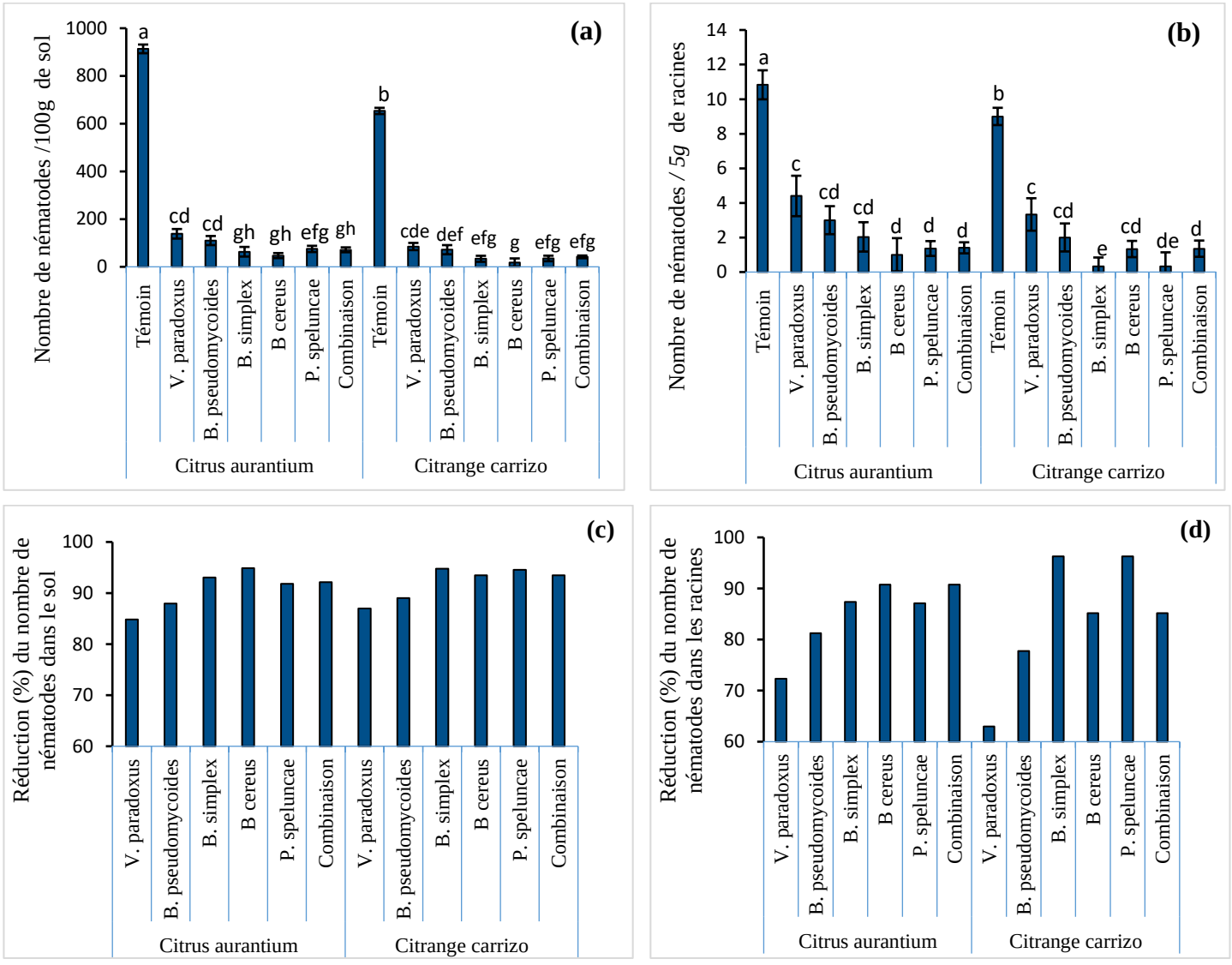


Figure 31. Effet des isolats bactériens sur la population de *Tylenchulus semipenetrans* dans le sol rhizosphérique (a) et dans les racines (b) et sur le taux de réduction de cette population dans le sol rhizosphérique (c) et dans les racines (d) chez *Citrus aurantium* et *Citrange carrizo* sous serre. Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

b. Effet des isolats fongiques sur les paramètres phytonématologiques

Les résultats de l'étude *in vivo* ont montré que tous les traitements fongiques utilisés ont significativement réduit les populations de *T. semipenetrans* au niveau des sols ($P < 0,0001$) et des racines ($P < 0,0001$) par rapport au témoin chez les deux variétés porte-greffes d'agrumes, *Citrus aurantium* et *Citrange Carrizo*. Cependant, l'activité nématicide a significativement varié entre les différents isolats fongiques ($p < 0,001$). En effet, au niveau du sol rhizosphérique et en présence d'*A. terreus*, une réduction significative de la population de *T. semipenetrans* a été observée, atteignant 94,89% chez *Citrus aurantium*et de 97,14% chez *Citrange Carrizo* (**Figure 32 a, c**). Au niveau des racines, les taux de réduction ont fluctué entre 96,30% et 74,07%, respectivement en présence d'*A. terreus*, et la combinaison des trois champignons chez *Citrange Carrizo*. Tandis que pour *Citrus aurantium*, les taux de réduction ont oscillé entre 84,32% avec *A. ustus* et 68,94% avec *P. lilacinus* (**Figure 32 b, d**).

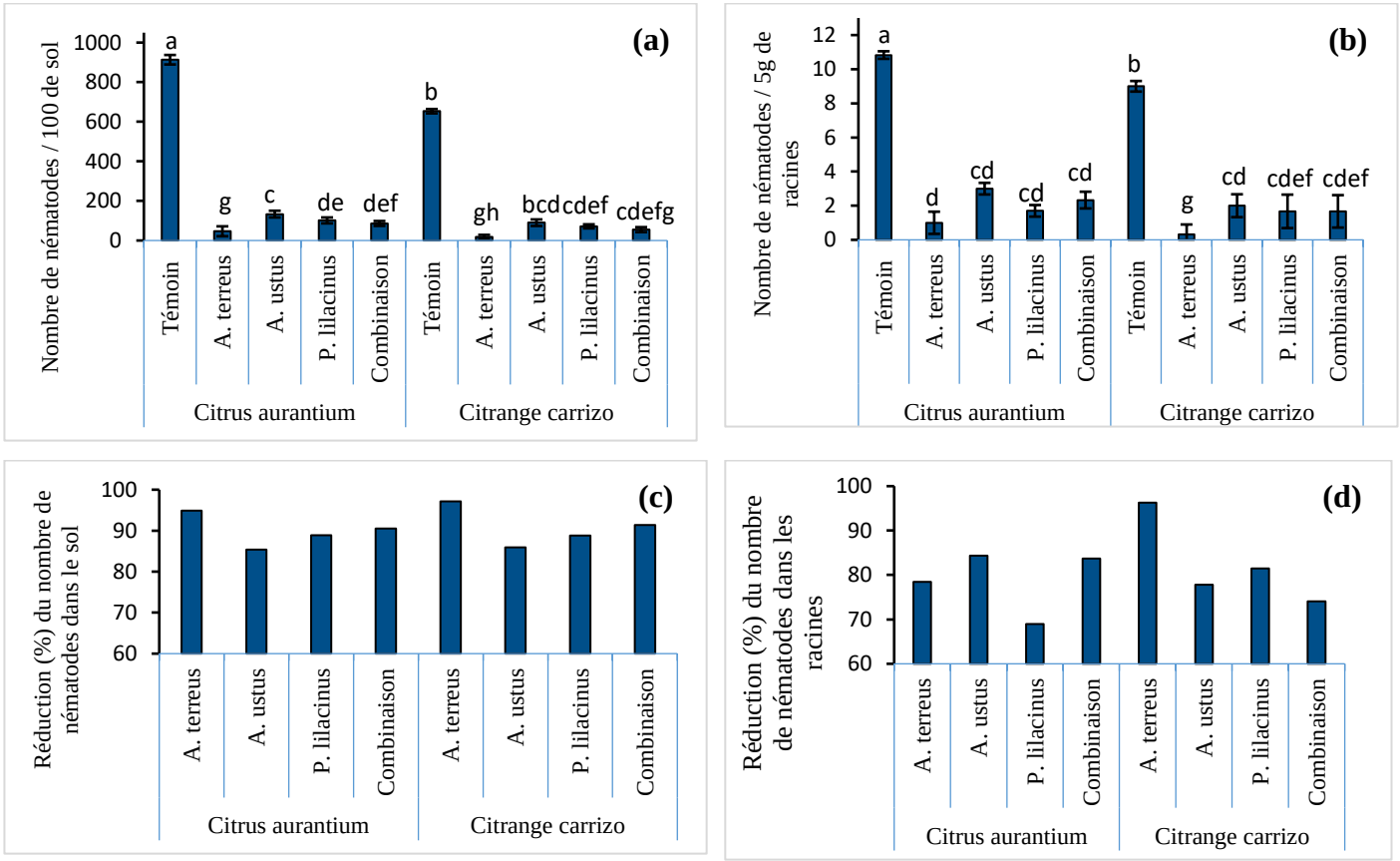


Figure 32. Effet des isolats fongiques sur la population finale de *T. semipenetrans*, dans le sol rhizosphérique (a) et dans les racines (b), et sur le taux de réduction de cette population dans le sol rhizosphérique (c) et dans les racines (d) chez *Citrus aurantium* et *Citrange carrizo* sous serre. Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

c. L'effet des isolats bactériens sur les paramètres agronomiques des plantes

Les résultats de la **Figure 33** montrent que l'utilisation des bactéries, *V. paradoxus* (**OQ651063**), *B. pseudomycoides* (**OQ652044**), *B. simplex* (**OQ651985**), *B. cereus* (**OQ651999**), *P. speluncae* (**OQ652010**) ou d'une combinaison de ces isolats bactériens à une concentration de $3,6 \times 10^5$ Cellules/ml, améliore de manière significative la croissance, allongement aérien ($p < 0,0001$) et racinaire ($p < 0,0001$), et la production de biomasse sèche des racines ($p < 0,05$) et des pousses ($p < 0,05$) chez les porte-greffes d'agrumes *Citrus aurantium* et *Citrange Carrizo* inoculés par *T. semipenetrans* par rapport à leurs témoins I (inoculé par *T. semipenetrans* seulement) respectifs. En effet, les isolats bactériens testés ont induit un accroissement aérien et racinaire et une accumulation de biomasse sèche aérienne et racinaire au moins 10,42%, 31,18%, 2,45% et 5,22% respectivement plus élevés comparés au témoin I chez les des deux porte-greffes inoculés avec *T. semipenetrans*. L'amélioration de la croissance des pousses et des racines des plants d'agrumes inoculés avec *T. semipenetrans* a significativement varié en fonction des souches bactériennes utilisées (**Figure 33**). En effet, l'accroissement de la longueur des pousses a varié entre 95,82% en présence de la combinaison des cinq bactéries et 40,17% en présence de *B cereus* chez *Citrange Carrizo* (**Figure 33 a, c**). Chez *Citrus aurantium*, cette augmentation a varié entre 55,73% en présence de *P. speluncae* et 10,42% en présence de *B cereus*. Par ailleurs, l'accroissement de la longueur des racines le plus élevé par rapport au témoin I a été induit par la combinaison des cinq bactéries, avec 67,9% chez *Citrus aurantium* et 72,04% chez *Citrange Carrizo* (**Figure 33 a, c**).

La masse sèche des pousses a été significativement influencée par les différents traitements. Elle a augmenté d'environ 36,38% et 2,45% par rapport au témoin I, respectivement avec le traitement combiné des cinq bactéries et avec *V. paradoxus* chez *Citrange Carrizo*. Pour *Citrus aurantium*, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le traitement combiné (89,12%), suivi de *P. speluncae* (65,37%) et *B. pseudomycoides* (63,80%) (**Figure 33 b, d**).

La masse sèche des racines a également augmenté Chez *Citrange Carrizo* atteignant 14,57g avec le traitement combiné des cinq bactéries et 9,2g avec le traitement par *V. paradoxus*, soit des augmentations respectives de 94,22% et 22.67% par rapport au témoin I. Pour *Citrus aurantium* le traitement combiné a engendré le taux d'accroissement de la biomasse sèche des racines le plus élevé (33,73%), suivi de *B cereus* (23,69%) et de *B. pseudomycoides* (17,67%) (**Figure 33 b, d**).

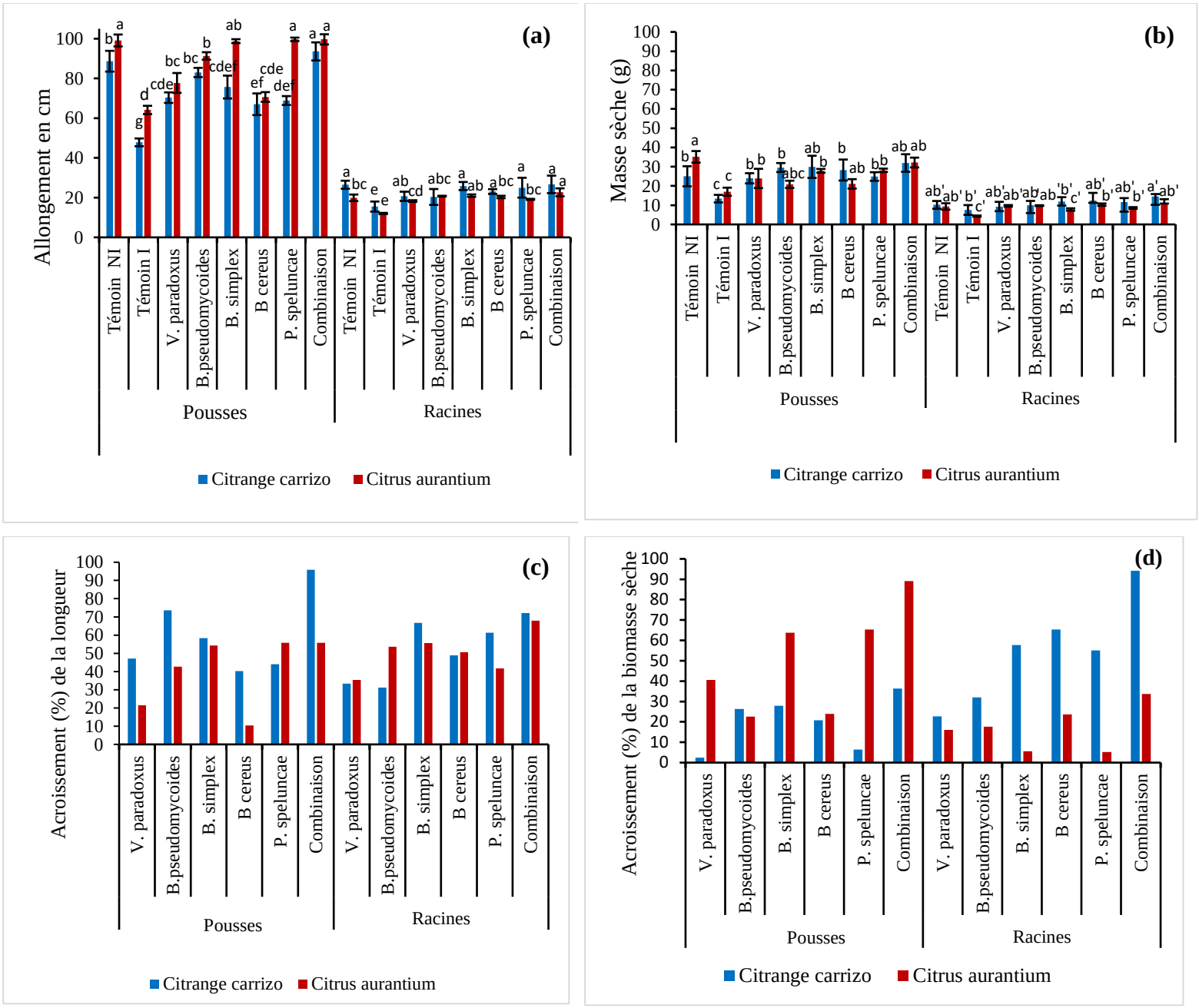


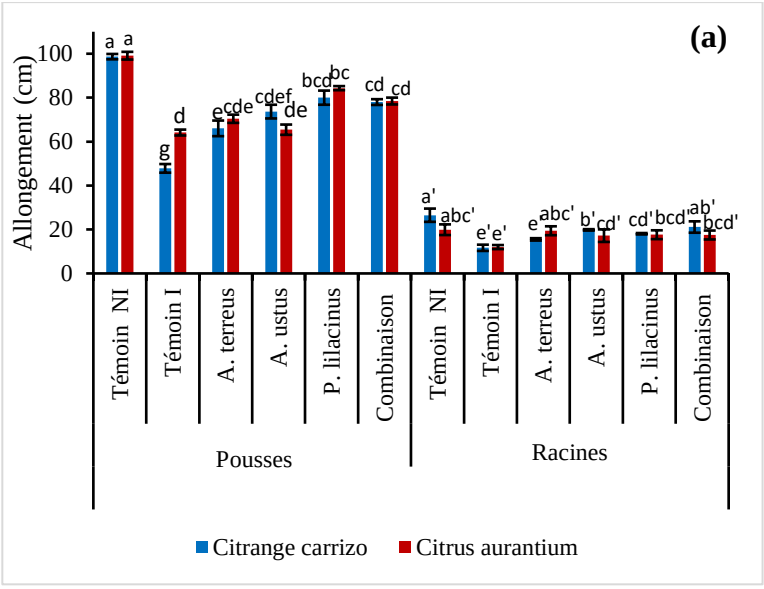
Figure 33. Effet des isolats bactériens sur l'allongement des pousses et des racines (a), la production de biomasse sèche des pousses et des racines (b), et sur le taux d'accroissement de la longueur aérien et racinaire (c) et des biomasses aérienne et racinaire (d) chez *Citrange carrizo* et *Citrus aurantium* inoculées (I) ou non (NI) avec *T. semipenetrans* et cultivées sous serre. Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0.05$.

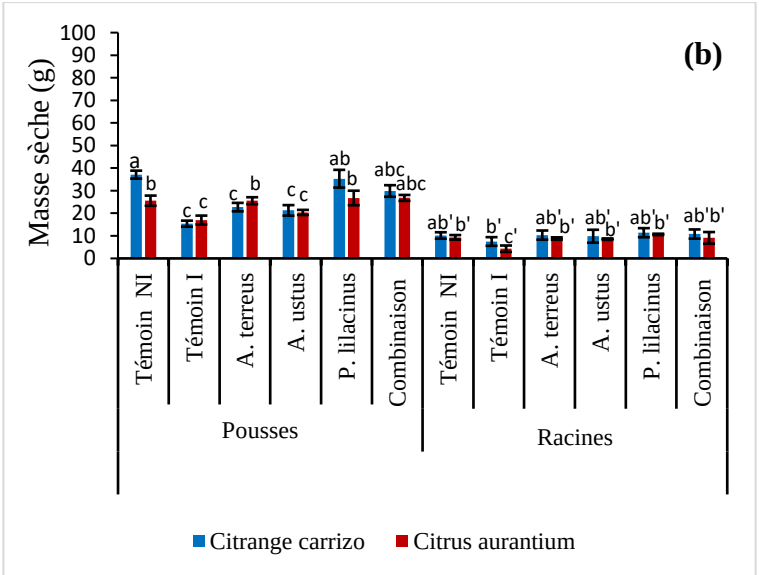
d. L'effet des isolats fongiques sur les paramètres agronomiques des plantes

L'inoculation avec chacune des trois souches de champignons, *A. terreus* (**OR250916)**, *A. ustus* **(OR250163**) et *P. lilacinus*, seuls ou en combinaison, à une concentration de 10^8 /ml, a significativement amélioré la croissance de l'allongement aérien ($p < 0,0001$) et racinaire (p

< 0,0001), ainsi que de la production de biomasse sèche des racines ($p < 0,05$) et des pousses ($p < 0,05$) chez les porte-greffes d'agrumes *Citrus aurantium* et *Citrange Carrizo* inoculés par *T. semipenetrans*, comparés à leurs témoins I (inoculés uniquement par *T. semipenetrans*) respectifs (**Figure 34**). L'amélioration de la croissance des pousses et des racines des plants d'agrumes inoculés avec *T. semipenetrans* a significativement varié en fonction des souches fongiques utilisées ($p <0,001$) (**Figure 34**). En effet, l'augmentation de la longueur des pousses a oscillé entre 67,36% et 38,15% en présence de *P. lilacinus* et *A. terreus*, respectivement, chez *Citrange Carrizo*, et entre 31,77% et 2,24% en présence de *P. lilacinus* et *A. ustus* respectivement chez *Citrus aurantium*. Par ailleurs, l'augmentation la plus notable de la longueur des racines a été observée avec *A. terreus* (43,95 %) chez *Citrus aurantium* et avec la combinaison des trois champignons (36,34 %) chez *Citrange Carrizo* (**Figure 34 a, c**).

La masse sèche des pousses a été améliorée de plus de 57% avec *P. lilacinus* ou la combinaison des trois champignons chez *Citrus aurantium*, et de plus 50% avec *P. lilacinus* chez *Citrange Carrizo*. L'accroissement de la masse sèche des racines le plus élevé a été observé lors de l'application de *P. lilacinus*, soit une augmentation de 52,01% chez *Citrange Carrizo* et de 28,11% chez *Citrus aurantium* (**Figure 34 b, d**).





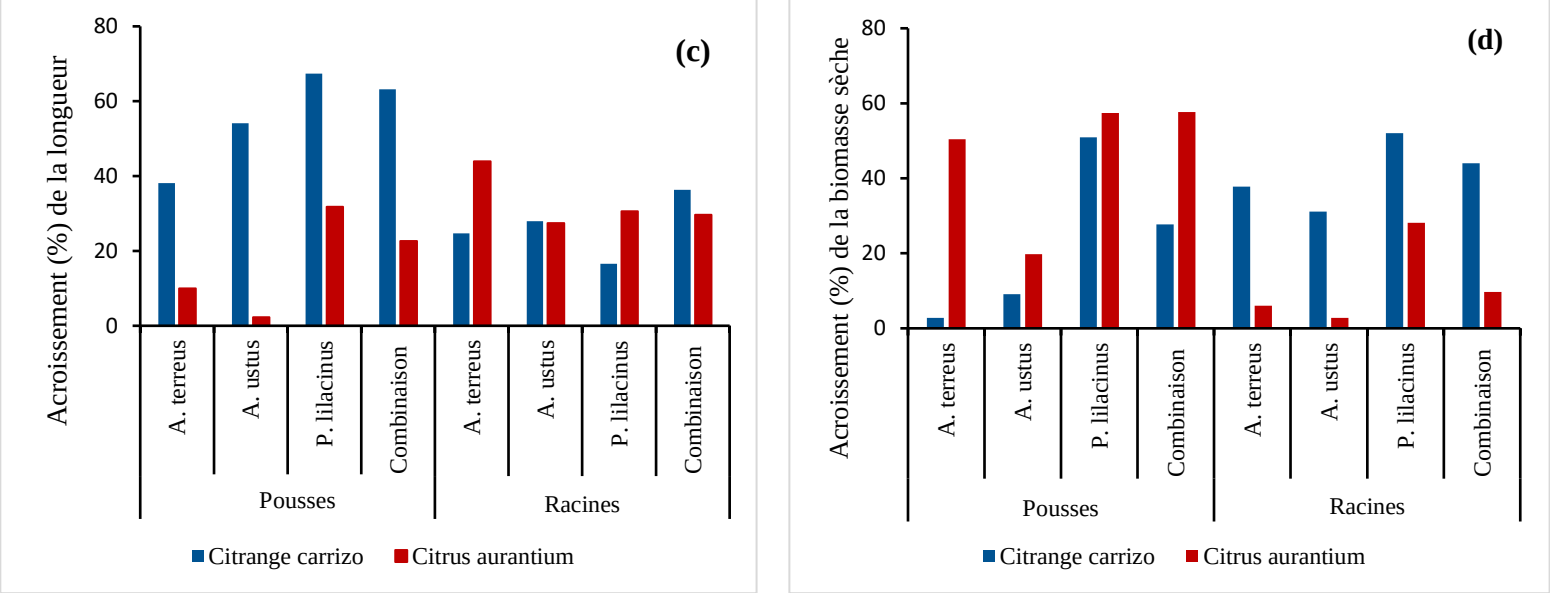


Figure 34. Effet des isolats fongiques sur l'allongement des pousses et des racines (a), la biomasse sèche des pousses et des racines (b), et sur le taux d'accroissement de la longueur aérien et racinaire (c) et des biomasses aérienne et racinaire (d) chez *Citrange carrizo* et *Citrus aurantium* inoculées (I) ou non (NI) avec *T. semipenetrans* et cultivées sous serre. Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

7. Cinétique de l'activité nématicide des filtrats de cultures liquides bactériennes et fongiques, en conjonction avec la cinétique de croissance bactérienne et fongique associée

a. Étude de la cinétique de l'efficacité nématicide des filtrats issus de cultures liquides bactériennes testées ainsi que la cinétique de la croissance bactérienne associée

Des échantillons de la culture liquide de chaque antagoniste bactérien ont été prélevés quotidiennement et filtrés. Ces filtrats ont ensuite été utilisés pour l'étude de la cinétique de la croissance des isolats bactériens et de l'activité nématicide de leurs filtrats contre le nématode phytoparasite *T. semipenetrans.* Les résultats présentés sur la **Figure 35** montrent un effet significatif des filtrats bactériens sur la mortalité des juvéniles de *T. semipenetrans*. En effet, chez toutes les souches bactériennes, l'activité nématicide augmente rapidement au cours des trois premiers jours pour atteindre des taux qui dépassent 48% chez *B. cereus*, 45% chez *Bacillus pseudomycoides*, 40% chez *Bacillus simplex*, 35% chez *Variovorax paradoxus*, et 30% chez *Paracoccus speluncae*, (**Figure 35**). Chez *Bacillus cereus* (**OQ651999**), le taux de mortalité a continué à augmenter rapidement et affiche un maximum de 55 % après 4 jours d'incubation, il diminue légèrement par la suite pour se stabiliser à des valeurs supérieures à 30%. En revanche, l'activité nématicide a continué à augmenter doucement au cours des deux

ou trois jours suivants chez les quatre autres souches pour atteindre des valeurs maximales et à des périodes d'incubation qui ont varié avec les souches :

Le filtrat de la souche *Variovorax paradoxus* (**OQ651063**) a montré une activité nématicide maximale (46,55%) après 5 jours d'incubation. Cette activité a diminué rapidement au cours du 6ème jour, puis doucement au cours des 5 jours suivants à la valeur de 16,33%.

En ce qui concerne *Bacillus simplex* (**OQ651985**), le filtrat de la culture liquide a donné l'activité nématicide la plus élevée (67,58%) après 6 jours d'incubation. Cette activité a rapidement diminué au cours des deux jours suivants, puis doucement par la suite pour atteindre une valeur de 33% après 10 jours d'incubation.

Le filtrat de la souche *Bacillus pseudomycoides* (**OQ652044**) a montré une activité nématicide maximale (63%) après 6 jours d'incubation. Cette activité a diminué rapidement au cours du 6ème jour, puis doucement au cours des 5 jours suivants pour afficher un taux de mortalité de 17,03% après 10 jours d'incubation.

Le filtrat de la culture liquide de *Paracoccus speluncae* (**OQ652010**), a démontré une activité nématicide élevée (60,69%) après 7 jours d'incubation. Cette activité a diminué rapidement au cours du 8ème jour, puis doucement par la suite pour atteindre la valeur de 23% au 10ème jours d'incubation.

Le dénombrement quotidien des cellules viables pour chaque souche bactérienne a révélé que la cinétique de croissance des bactéries suit une allure similaire à celle de l'activité nématicide de leurs filtrats. Chez la plupart des souches, *Variovorax paradoxus*, *Bacillus pseudomycoides*, *Paracoccus speluncae* et *Bacillus cereus*, le pic d'activité nématicide coïncide avec le pic de croissance bactérienne. En effet, pour la souche *Variovorax paradoxus*, l'activité nématicide maximale du filtrat (atteinte après 5 jours d'incubation) coïncide avec le pic de croissance cellulaire ($4{,}6\times10^5$ Cellules/ml) observé au 4ème et 5èmejours d'incubation. De même, pour *Bacillus pseudomycoides*, le pic d'activité nématicide du filtrat atteint après 5 jours d'incubation est concomitant au pic de croissance cellulaire observé ente 4-6 jours d'incubation ($5{,}77\times10^5$ Cellules/ml) d'incubation. En revanche, pour *Bacillus simplex*, le pic de croissance cellulaire observé après 4 jours d'incubation ($3{,}67\times10^5$Cellules/ml) est décalé de 2 jours par rapport au pic d'activité nématicide du filtrat atteint au 6ème jours d'incubation (**figure 35**).

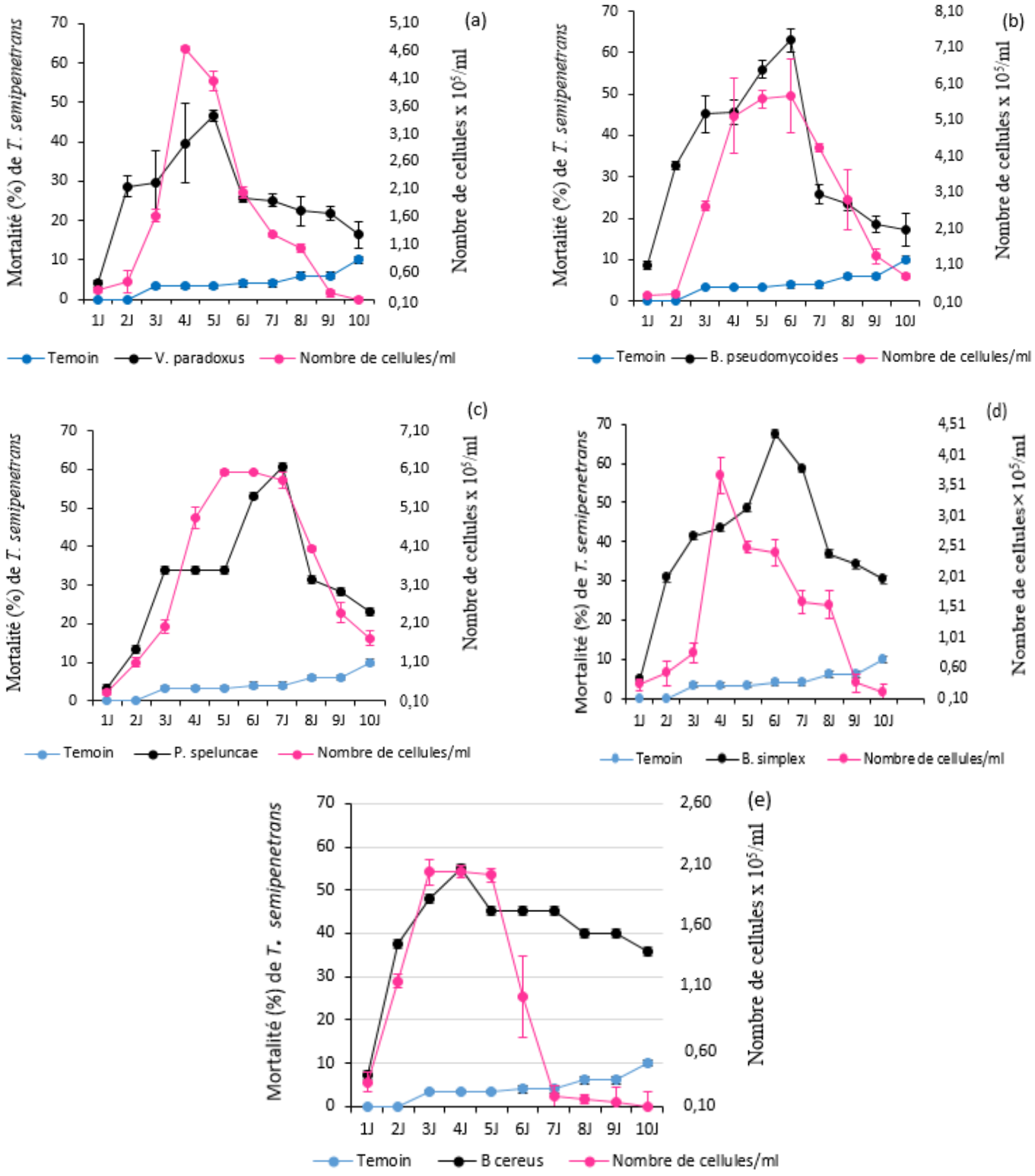


Figure 35. Cinétiques de production des nématicides et évolution de la biomasse (cellules viables) des bactéries *Variovorax paradoxus* (a), *Bacillus pseudomycoides* (b), *Paracoccus speluncae* (c), *Bacillus simplex* (d) et *Bacillus cereus* (e) (—●—: Activité nématicide chez le témoin ; —●—: Activité nématicide chez le filtrat bactérien ; —●— Nombre de cellules viables/ml).

b. Etude de la cinétique de l'activité nématicide des filtrats issus de cultures liquides fongiques conjointement avec la cinétique de croissance des champignons associée

Des prélèvements quotidiens ont été effectués à partir des cultures fongiques, puis filtrés et testés pour leur activité nématicide contre le nématode phytoparasite *T. semipenetrans* afin d'étudier la cinétique de leur activité nématicide et de déterminer le moment optimal de la production des nématicides. Les résultats sont présentés dans la **Figure 36**. La biomasse fongique a été mesurée pour identifier la quantité de biomasse responsable de l'activité nématicide maximale (**Figure 37**).

Le filtrat de la culture liquide de *Paecilomyces lilacinus* a entrainé un taux de mortalité de 100% après 25 jours d'incubation coïncidant avec une biomasse fongique maximale de 104,02 mg/ml (**Figure 37**). L'activité nématicide diminue ensuite à 66% de mortalité après 27 jours d'incubation, alors que la biomasse fongique demeure stable jusqu'au 30ème jours.

En ce qui concerne d'*Aspergillus terreus* (**OR250916)**, le filtrat de la culture liquide a donné l'activité nématicide la plus élevée (82,66 %) après 24 jours d'incubation coïncidant avec une biomasse fongique maximale de 153,16 mg/ml (**Figure 37**). L'activité nématicide a ensuite diminué, atteignant un taux de mortalité de 30 % après 27 jours d'incubation, tandis que la biomasse fongique reste stable jusqu'au 30ème jour.

Le filtrat de la culture liquide d'*Aspergillus ustus* **(OR250163)** a montré une activité nématicide maximale (77,03%) après 20 jours d'incubation de la culture concomitante à une biomasse fongique de 108,79 mg/ml (**Figure 37**). Cette activité nématicide a ensuite diminué, atteignant un taux de mortalité de 32,65 % après 27 jours d'incubation. Parallèlement, la biomasse fongique a connu une augmentation rapide au cours des deux jours consécutifs, suivie d'une stabilisation jusqu'au 30ème jour.

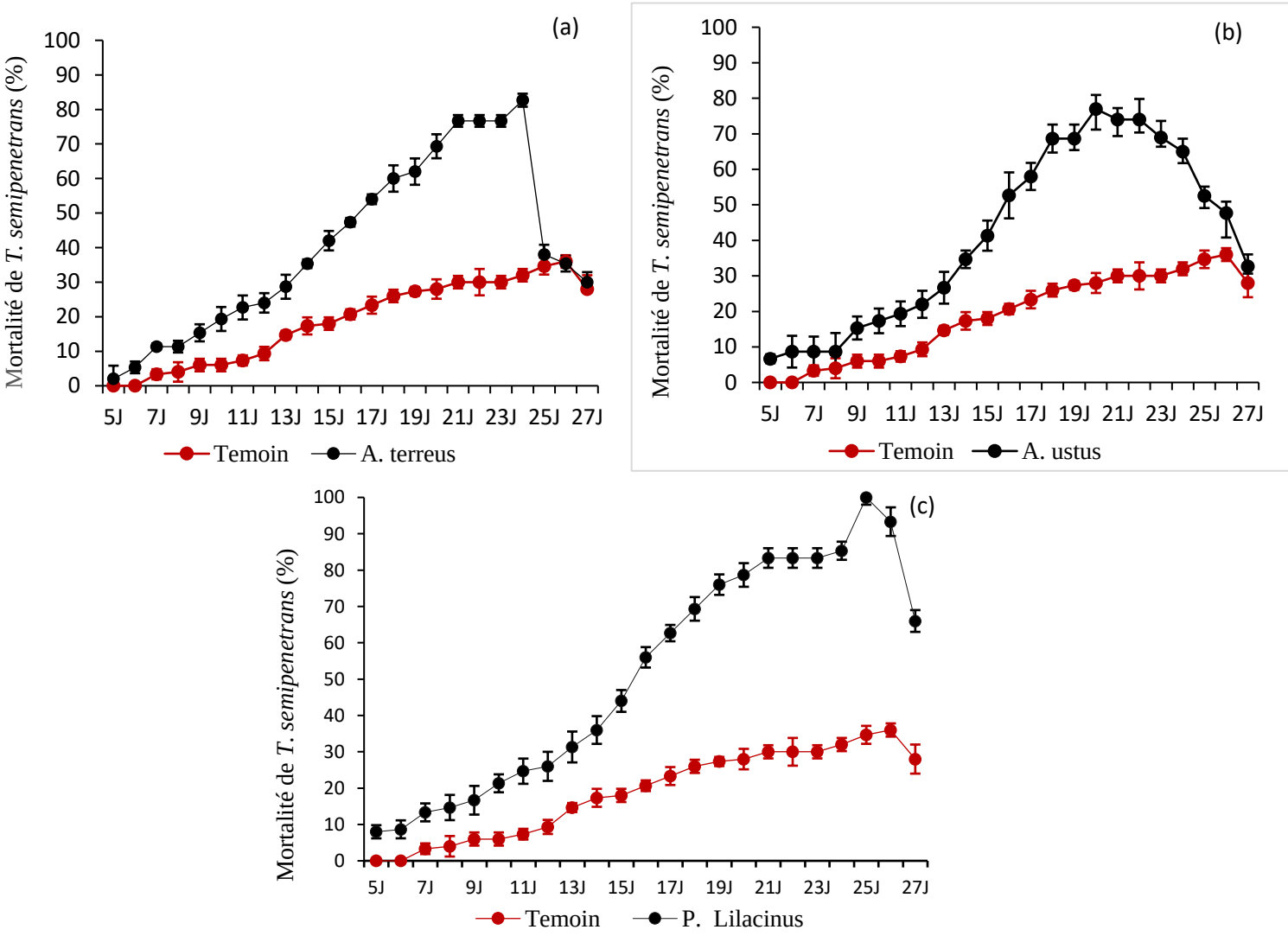


Figure 36. Cinétiques de production des nématicides des souches fongiques *Aspergillus terreus* (a), *Aspergillus ustus* (b) et *Paecilomyces lilacinus*(c).

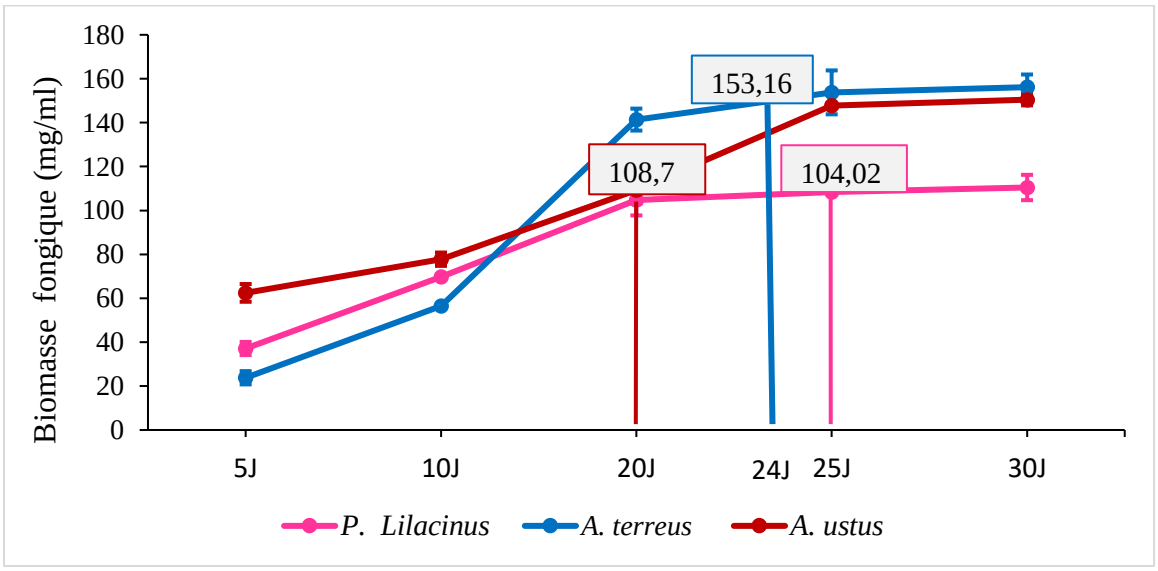


Figure 37. Cinétique de la croissance de la biomasse fongique (mg/ml).

8. Distribution et caractérisation morphologique des spores de champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)

Le test de piégeage a fourni des spores fraîches et saines pour l'identification des différentes espèces contenues dans les sols des principales régions agrumicoles nationales. Les spores ont été séparées en fonction de leurs caractéristiques morphologiques. L'observation des spores sous la loupe binoculaire et au microscope a révélé la présence d'au moins sept morphotypes différents (**Figure 38**).

Morphotype 1 : taille : 50 µm, de couleur subhyaline à jaune pâle, avec une forme globose/subglobose (**Figure 38 a**), identifié comme étant *Acaulospora* sp 1.

Morphotype 2 : taille : 63 µm, de couleur orange à orange brunâtre avec une forme globose/subglobose (**Figure 38b**), identifié comme étant *Glomus* sp 1.

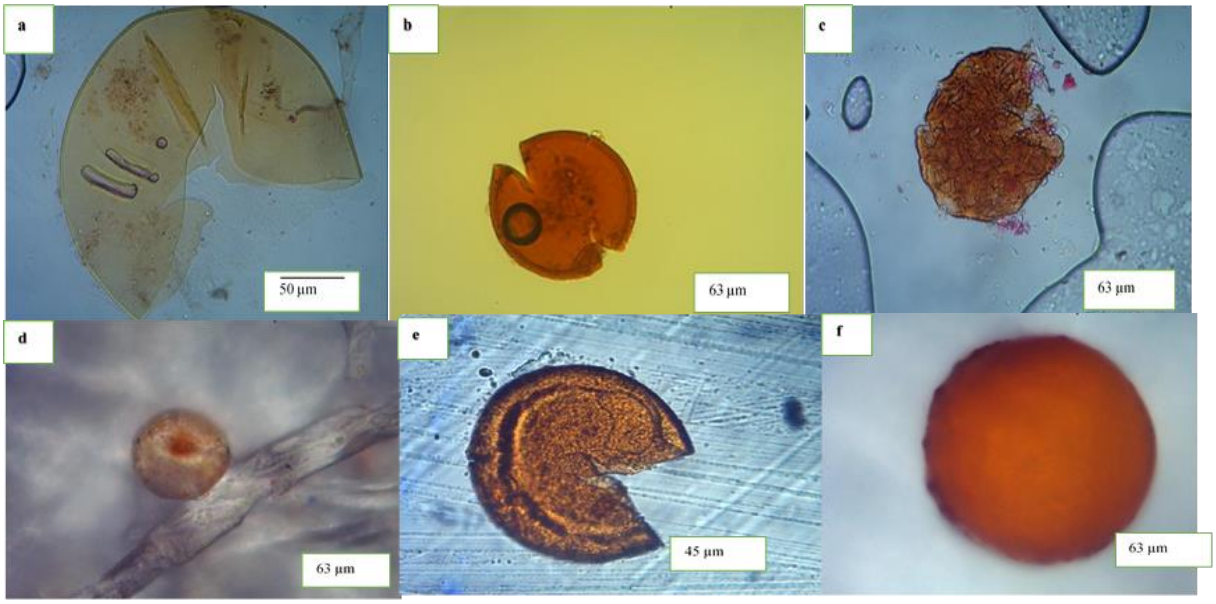
Morphotype 3 : taille : 63 µm, de couleur brune-rougeâtre avec une forme globose/irrégulière (**Figure 38 c**), identifié comme étant *Acaulospora* sp 2.

Morphotype 4 : taille : 63 µm, rouge-jaunâtre avec une forme ronde/globose avec la présence d'un hyphe d'attachement (**Figure 38 d**), identifié comme étant *Rhizophagus* sp.

Morphotype 5 : taille : 45 µm, de couleur rouge claire ou foncée avec une forme globose avec un contenu très riche en réserves lipidiques sous forme de gouttelettes (**Figure 38 e**), identifié comme étant *Glomus* sp.2.

Morphotype 6 : taille : 63 µm, de couleur orange clair à orange foncé, avec une forme ronde/globose (**Figure 38 f**), identifié comme étant *Glomus* sp.3

Morphotype 7 : taille : 120 µm, de couleur rouge foncé, avec une forme ronde/globose (**Figure 38 g**), identifié comme étant *Funneliformis* sp.



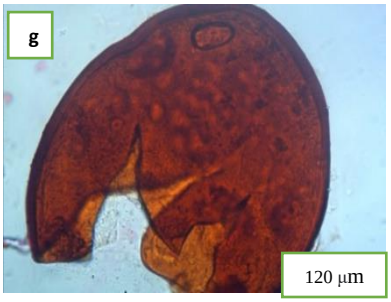


Figure 38. Spores de CMA observées sous un microscope optique à 400X. a : *Acaulospora* sp.1, b : *Glomus* sp.1, c : *Acaulospora* sp.2, d : *Rhizophagus* sp. e : *Glomus* sp.2 f : *Glomus* sp.3, g : *Funneliformis* sp.

L'analyse de l'abondance relative des spores de CMA (**Tableau 32**) montre que le genre *Funneliformis* sp. est le plus abondant, avec une densité relative de 62,5% à Beni Mellal-Khenifra et d'environ 48,8% au niveau de la région de Souss-Massa et de Berkane.. Le genre *Rhizophagus* sp. est également assez abondant, avec une densité de 77,15% au niveau de la région de Gharb, 48% au niveau de la région de Souss-Massa et19,7% au niveau de la région de Beni Mellal. Ce qui nous a conduit à tester l'efficacité de ces genres vis-à-vis du nématode des agrumes *T. semipenetrans*.

Tableau 32. Diversité et abondance des spores de CMA au niveau des sols rhizosphériques au niveau des principales régions agrumicoles marocaines.

Site	Reference	Taille (µm)	Abondance relative (%)
Souss-Massa	*Glomus* sp.1	63µm	25,18
	Funneliformis sp.	120 µm-250 µm	48,82
	Rhizophagus sp.	63 µm	48
	Acaulospora sp.2	63 µm	8,22
	Acaulospora sp. 1	63 µm	8,66
Marrakech-Safi	*Acaulospora* sp.1	63 µm	13,56
	Glomus sp.1	63 µm	25,78
	Glomus sp.2	45µm-63 µm	23,40
	Glomus sp.3	63 µm	32,70
Beni Mellal-Khenifra	*Glomus* sp.1	63 µm	24,11
	Funneliformis sp.	120 µm-250 µm	62,52
	Rhizophagus sp.	63µm	19,7
Gharb	*Rhizophagus* sp.	63 µm	77,15
	Glomus sp. 1	63µm	15,67
Berkane	*Glomus* sp. 1	63 µm	9,89
	Funneliformis sp.	120 µm-250 µm	48,71
	Glomus sp.2	45µm- 63µm	14,12
	Glomus sp.1	63µm	7,33

9. Effet de CMA sur *T. semipenetrans*

a. Analyse de la mycorhization des porte-greffes d'agrumes

L'observation microscopique des fragments de racines des deux porte-greffes *Citrange carrizo* et *Citrus aurantium* réalisées après 12 semaines de l'essai en conditions semi-contrôlées ont montré que les souches de CMA *Funneliformis mosseae* et *Rhizophagus irrigularis* ont été capables de coloniser les racines des deux porte-greffes d'agrumes étudiés. En effet, la présence des structures mycorhiziennes (hyphes, arbuscules, et/ou vésicules) a été notée chez toutes les plantes inoculées par les CMA (**Figure 39**). Par ailleurs, aucune structure mycorhizienne n'a été observée au niveau des racines des plantes non-inoculées (**Figure 39**). La fréquence de mycorhization (%F) a été de 100% pour tous les plants d'agrumes inoculés par *Funneliformis mosseae* et *Rhizophagus irrigularis.*

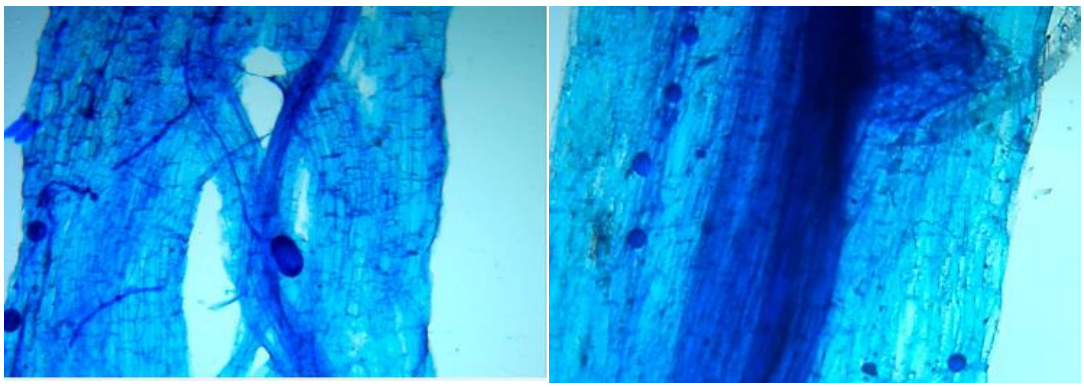


Figure 39. Observation microscopique des structures mycorhiziennes (hyphes, arbuscules et vésicules) au niveau des racines des porte-greffes d'agrumes Citrange carrizo et Citrus aurantium inoculées avec *Funneliformis mosseae* et *Rhizophagus irrigularis*. Grossissement ×40.

b. Effet des CMA sur les paramètres phytonématologiques

Les résultats ont montré que les deux souches de champignons mycorhiziens, *Funneliformis mosseae* et *Rhizophagus irrigularis,* ont significativement réduit la population de *T. semipenetrans* dans le sol rhizosphérique ($P< 0,001$) et dans les racines ($P< 0,001$) des deux porte-greffes d'agrumes étudiés. Au niveau du sol, les taux de réduction enregistrés ont été respectivement de 95,44 % et 86,5 % chez le bigaradier, et de 95,57 % et 80,47 % chez *Citrange Carrizo* **(figure 40 a, c**). Au niveau des racines, comparé au témoin non mycorhizé, les taux de réductions de la population de *T. semipenetrans* respectifs ont été de 81,55 % et 63,10 % chez le bigaradier, et de 88,89 % et 77,78 % chez *Citrange Carrizo* (**figure 40 b, d**).

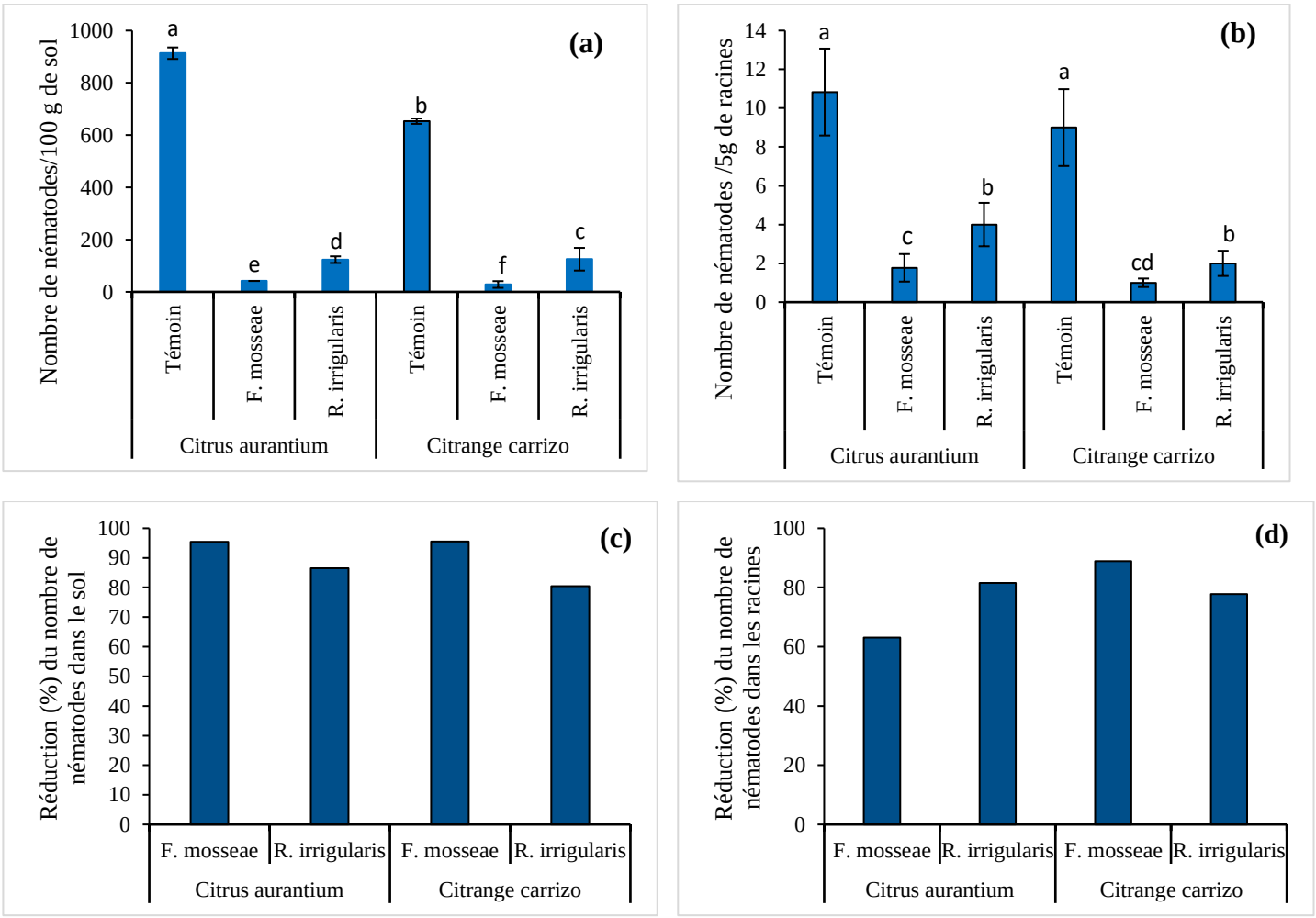


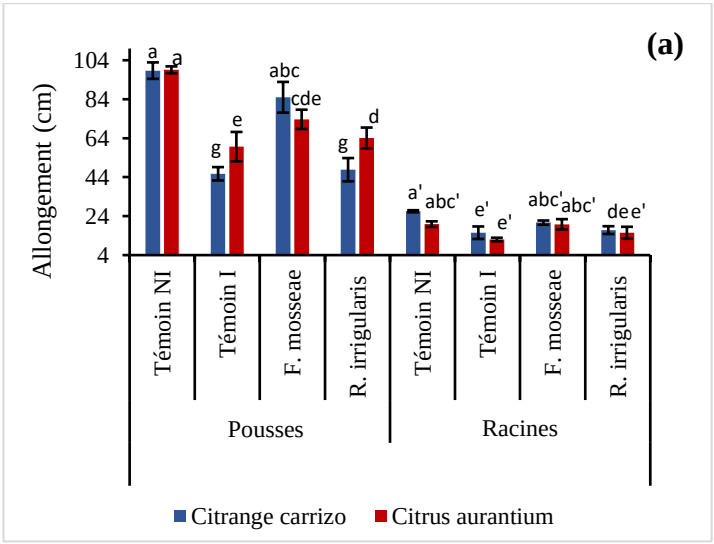
Figure 40. Évaluation de l'effet de *Funneliformis mosseae* et *Rhizophagus irregularis*, sur la population finale de *Tylenchulus semipenetrans* dans le sol rhizosphérique (a) et dans les racines (b) sur le taux de réduction de cette population dans le sol rhizosphérique (c) et dans les racines (d) chez les porte-greffes d'agrumes *Citrus aurantium* et *Citrange Carrizo* sous serre. Les moyennes suivies par des lettres différentes dans la même sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

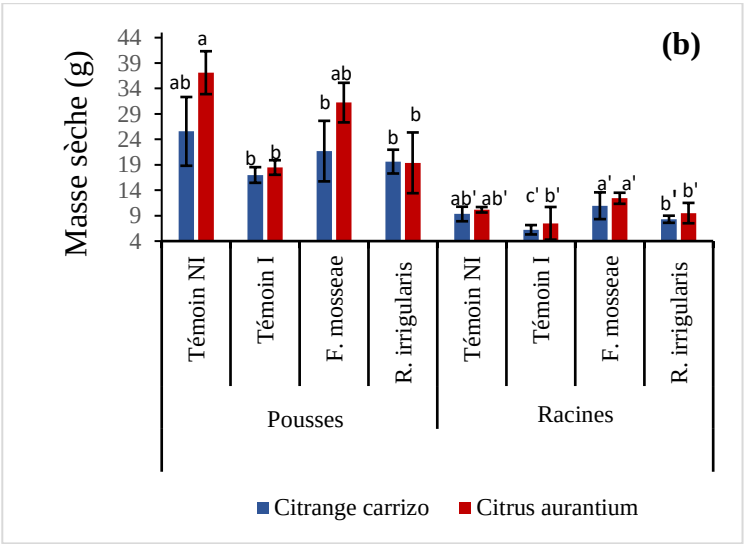
c. Effet des CMA sur les paramètres agronomiques des plantes

L'analyse statistique a révélé que l'inoculation des porte-greffes d'agrumes *Citrus aurantium* et *Citrange Carrizo* infestés par *T. semipenetrans* par les deux souches de CMA, *Funneliformis mosseae* et *Rhizophagus irrigularis* a amélioré de manière significative l'allongement aérien ($p < 0,0001$) et racinaire ($p < 0,0001$) ainsi que la biomasse sèche des racines ($p < 0,05$) et des pousses ($p < 0,05$) en comparaison avec le témoin I (inoculés uniquement par *T. semipenetrans*) (**Figure 41 a, b, c, d**). L'infestation des porte-greffes d'agrumes par *T. semipenetrans* a affecté les paramètres agronomiques des plantes, mais l'effet négatif a été plus prononcé chez les plantes non mycorhizées des deux porte-greffes, comparées aux plantes mycorhizées. L'amélioration des paramètres de croissance (longueur des pousses

et des racines), ainsi que la production de biomasse (masse sèche des pousses et des racines) a varié significativement en fonction de la souche de CMA utilisée (P<0,001). En effet, Par rapport aux témoins I, *Funneliformis mosseae* a induit une amélioration de la longueur des pousses de 85,87% et 23,46%, respectivement chez *Citrange Carrizo* et *Citrus aurantinum*. En revanche, *Rhizophagus irregularis* a entraîné une amélioration de la longueur des pousses de 7,47% et 4,59% respectivement chez *Citrus aurantinum* et *Citrange Carrizo* (**Figure 41 a, c**). Par ailleurs, l'accroissement le plus élevé de la longueur des racines (65,25%) a été observé chez *Citrange Carrizo* colonisé par *Funneliformis mosseae*. De même, une croissance maximale de la longueur des racines, évaluée à 11,3%, a été observée chez *Citrus aurantinum* lorsqu'il a été colonisé par la même souche, *Funneliformis mosseae* (**Figure 41 a, c**).

En ce qui concerne la masse sèche des pousses, toujours en comparaison avec le Témoin I, les porte-greffes *Citrus aurantinum* et *Citrange Carrizo* colonisées par *Funneliformis mosseae* ont accumulé la plus grande masse sèche des pousses, avec des taux d'accroissement respectifs de 69,08% chez *Citrus aurantinum* et 27,58% chez *Citrange Carrizo* (**Figure 41 b, d**).





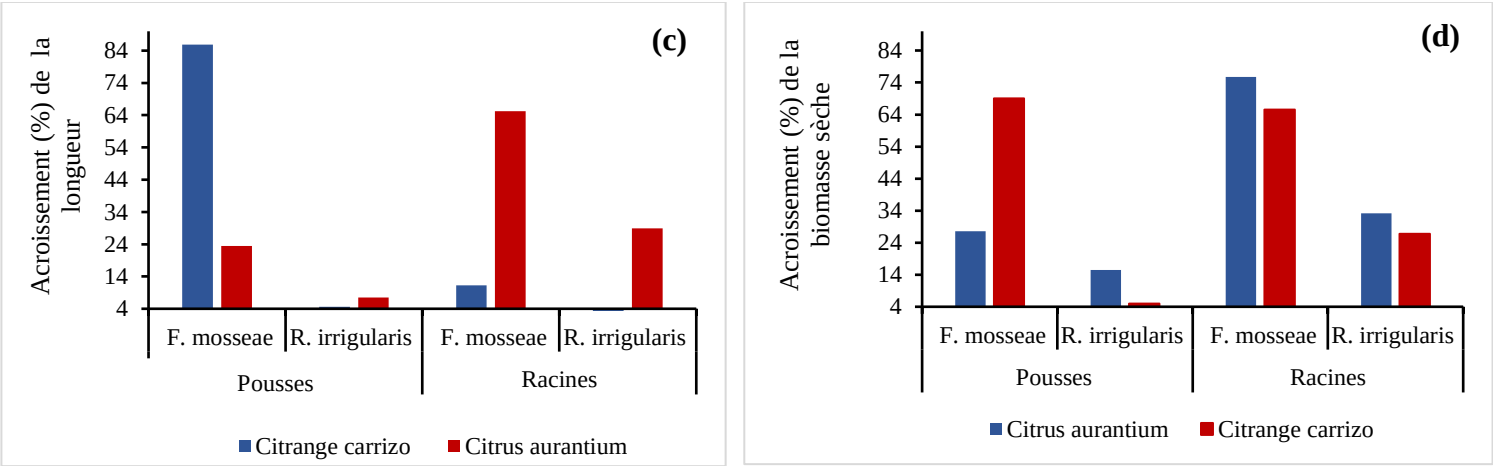


Figure 41. Effet des CMA, *Funneliformis mosseae* et *Rhizophagus irregularis*, sur l'allongement des pousses et des racines (a), la biomasse sèche des pousses et des racines (b), et sur le taux d'accroissement de la longueur aérienne et racinaire (c) et des biomasse aérienne et racinaire (d) chez les porte-greffes d'agrumes *Citrange carrizo* et *Citrus aurantium* inoculés (I) ou non (NI) avec *T. semipenetrans* et cultivés sous serre. Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

IV. DISCUSSION

L'exploration du rôle du microbiome (bactéries, champignons et champignons mycorhiziens) rhizosphérique dans la lutte contre les nématodes est un domaine de recherche passionnant qui a des implications majeures pour l'agriculture durable. Ces micro-organismes offrent des alternatives biologiques prometteuses aux méthodes conventionnelles de lutte chimique contre les nématodes. Cette étude a démontré l'efficacité de certains microorganismes isolés de la rhizosphère des agrumes comme les bactéries *Variovorax paradoxus* (**OQ651063**), *Bacillus pseudomycoides* (**OQ652044**), *Bacillus simplex* (**OQ651985**), *Bacillus cereus* (**OQ651999**) et *Paracoccus speluncae* (**OQ652010**), les champignons *Aspergillus terreus* (**OR250916)**, *Aspergillus ustus* **(OR250163**) et *Paecilomyces lilacinus* et les champignons mycorhiziens arbusculaires *Funneliformis mosseae et Rhizophagus irregularis* dans la lutte contre le nématode *Tylenchulus semipenetrans in vitro* et *in vivo* chez les porte greffes d'agrumes *Citrange Carrizo* (Citrange) et *Citrus aurantium*.

Les résultats des tests de confrontation *in vitro* ont montré que toutes les bactéries testées ont présenté des activités nématicides *contre T. semipenetrans* qui deviennent de plus en plus importantes avec l'augmentation de la concentration bactérienne et du temps d'incubation. Le pouvoir nématicide le plus élevé a été obtenu avec la concentration bactérienne de ($3,6 \times 10^5$ cellules/ml) pendant un temps d'incubation de 96h. En effet, une mortalité totale (100%) des J2 a été provoquée par l'effet combiné des différentes bactéries (co-inoculation mixte avec les

différentes bactéries) et par l'effet de l'inoculation simple avec *B. cereus* Les tests de confrontation *in vivo* effectués sur les porte-greffes d'agrumes *Citrus aurantium* et *Citrange Carrizo* ont non seulement validé l'efficacité nématicide considérable des *Bacillus* examinés, mais ont également mis évidence le rôle de ces microorganismes dans la stimulation de la croissance et la production de biomasse chez ces deux porte- greffes. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Labiadh *et al*. (2023) qui ont démontré que parmi cinq espèces bactériennes testées contre *T. semipenetrans*, *B. cereus* a provoqué le taux de mortalité le plus élevé (85%) chez les juvéniles (J2) après 6 jours d'exposition. Montasser *et al*. (2012) et AL-Khazraji and Hanawi (2022) ont également rapporté que l'exposition de *T. semipenetrans* a une concentration de 3.10^8 UFC/ml de *B. cereus* a produit 99 % de mortalité après 72 heures d'incubation. Des études sur les plantes en pot ont révélé que l'inoculation de *B. subtilis* et de *B. pumilus* a eu un effet perturbateur sur le cycle de reproduction de *Meloidogyne* spp. (Dihingia *et al*., 2017; El-Nagdi and Abd-El-Khair, 2019). D'autres essais expérimentaux ont été menés en Égypte, où l'application de *B. subtilis* (10^6 UFC/ml) sur des plants de *Citrus volkameriana* a permis de réduire les populations de *T. semipenetrans* de 65-70 % après trois mois d'application (Hammam *et al*., 2016). Des résultats similaires ont été obtenus par El-Mohamedy *et al*. (2016), qui ont signalé une mortalité de 74 % de *T. semipenetrans* suite à l'application de *B. subtilis* (10^6 CFU/ml) mélangé à du compost. Dans une étude en plein champ, Abd-Elgawad et al. (2010) ont constaté que l'application de *B. subtilis* (10^7 cellules/ml) avec ≥ 86 kg/arbre a permis d'obtenir les populations les plus faibles de *T. semipenetrans* et un rendement plus élevé d'orange douce par rapport aux témoins. *B. pseudomycoides* a également démontré un pouvoir nématicide élevé contre *T. semipenetrans*. Cette bactérie colonisatrice du sol est capable de se développer dans des milieux de culture pauvres en nutriments (Pandey *et al.*, 2001). Des études ont montré que cette souche bactérienne stimule significativement la croissance des racines, ce qui la rend prometteuse pour une utilisation contre les micro-organismes phytopathogènes (Labiadh *et al*., 2019).

Les résultats des tests *in vitro* indiquent que l'utilisation de *V. paradoxus* a permis de réduire considérablement le nombre de nématodes *T. semipenetrans*, notamment lorsqu'elle est utilisée à une concentration de $3,6 \times 10^5$ cellules/ml, soit un taux de mortalité de J2 de 58,58% après 96 heures d'incubation. Cependant, l'efficacité de *V. paradoxus* diminue avec la baisse de la concentration, atteignant seulement 36,36% à une concentration de $1,2 \times 10^3$ Cellules/ml. Les tests *in planta* ont également montré que *V. paradoxus* at permis de réduire les populations de *T. semipenetrans* de plus de 84% dans le sol chez *Citrus aurantium* et *Citrange Carrizo*.

L'utilisation de *V. paradoxus* a également amélioré les paramètres agronomiques des plantes d'agrumes, notamment l'allongement aérien et des racines ainsi que la masse sèche des pousses et des racines. Bien que l'utilisation de *V. paradoxus* en tant qu'agent de biocontrôle de nématodes phytoparasites ne soit pas courante, quelques études ont montré son efficacité, telles que celles menées par Neipp and Becker (1999) qui ont rapporté l'efficacité de *V. paradoxus* 12 contre le nématode *Heterodera schachtii* et par Aballay *et al*. (2012) qui ont montré l'efficacité du filtrat de *V. paradoxus* 1105 dans la suppression des dommages causés par le nématode *Xiphinema index* sur le système racinaire de la vigne. Néanmoins, l'utilisation de *V. paradoxus* pour lutter contre le nématode phytoparasite des agrumes *Tylenchulus semipenetrans* est méconnue et peu étudiée jusqu'à présent, ce qui fait de cette piste une avenue prometteuse mais encore largement inexplorée.

Les résultats obtenus avec l'utilisation de *P. speluncae* (OQ652010) dans la lutte contre *T. semipenetrans* sont très prometteurs. En effet, lorsqu'une suspension de *P. speluncae* a été confrontée à des juvéniles de *T. semipenetrans*, un taux de mortalité de 61,95 % a été observé après une exposition *in vitro* de 96 heures, à une concentration de $3,6 \times 10^5$ cellules/ml. De plus, l'inoculation par *P. speluncae* a réduit la reproduction de *T. semipenetrans* de 91,79 % chez *Citrus aurantium* et de 94,53 % chez *Citrange Carrizo*, tout en améliorant les paramètres agronomiques de ces deux types de plantes. Par ailleurs, le filtrat de la culture liquide de *P. speluncae* a montré une forte activité nématicide entraînant une mortalité de plus de 60% des juvéniles après sept jours d'incubation. Il convient de noter que l'utilisation de *P. speluncae* comme bionématicide était jusqu'à présent inconnue. Cette bactérie a été initialement isolée à partir de l'air de la grotte de Cueva Del Tesoro en Espagne (Jurado *et al*., 2017). Toutefois, notre étude a montré que cette souche a également été trouvée dans la rhizosphère des agrumes de la région de Berkane, élargissant considérablement son champ d'application en tant que bionématicide.

L'application d'une combinaison d'agents de biocontrôle est une stratégie efficace pour améliorer l'efficacité de la lutte contre les NPP, comme l'ont démontré nos résultats. Après une exposition de 96 heures à une concentration de $3,6 \times 10^5$ cellules/ml, la combinaison de cinq bactéries a entraîné une mortalité totale des juvéniles de *T. semipenetrans*. De plus, l'application combinée de bactéries a également réduit la reproduction des NPP dans les racines des plantes inoculées. Ces constatations sont en accord avec les résultats d'autres études menées par des scientifiques tels qu'El-Nagdi and Abd-El-Khair (2019) qui ont également montré que l'utilisation combinée de différentes souches de *Bacillus* spp., *B. subtilis* et *B. pumilus* est plus

efficace pour contrôler les NPP, comme *Meloidogyne incognita* que l'utilisation individuelle. De plus, Cruz-Magalhães *et al*. (2022) ont observé une forte immobilité des J2 de *Meloidogyne* spp. après l'application d'un mélange de filtrats de différentes souches de *Bacillus* BMH et INV. De même Engelbrecht *et al.* (2022) ont montré que le mélange de filtrats de *B. cereus, B. megaterium, B. subtilis et B. thuringiensis* a entraîné une immobilité d'environ 85-90% des J2 de *Meloidogyne* spp. après une période d'incubation de 96 heures.

Nos résultats ont également montré que toutes les souches bactériennes étudiées sont capables d'inhiber totalement l'éclosion des œufs et ont engendré des taux de mortalité très élevés *in vitro*. Les Bacillus, notamment *B. simplex* (OQ651985) et *B. cereus* (OQ651999), présentent des capacités de biocontrôle beaucoup plus importantes. Il est possible que ces souches produisent des métabolites secondaires (des nématicides) tels que, des enzymes lytiques, des toxines et des composés organiques volatils, ce qui en fait les meilleurs agents de biocontrôle de *T. semipenetrans* (Viljoen *et al*., 2019; El-Ashry *et al.*, 2023). Des recherches récentes ont montré que *B. cereus* Bc-cm103 peut produire des composés organiques volatils tels que le disulfure de diméthyle, l'isovalérate de méthyle et la 2-undécanone, qui présentent une forte activité nématicide contre *M. incognita* (Yin *et al*. 2021). Une autre bactérie favorisant la croissance des plantes, *Bacillus mycoides* R2, a été trouvée capable de produire du styrène volatil pour tuer efficacement le nématode *Meloidogyne. incognita*. Cette bactérie a démontré une activité nématicide supérieure à celle des nématicides couramment utilisés tels que le thiaclopride et le cadusafos (Luo *et al*., 2018). *Paracoccus speluncae* (OQ652010) a mis en évidence son efficacité en tant qu'agent de biocontrôle contre *T. semipenetrans*. Cette bactérie est capable de lyser les œufs et les juvéniles des nématodes, ce qui suggère que cette souche produit des enzymes hydrolytiques, en particulier des protéases, des collagénases et des chitinases, qui jouent un rôle important dans la dégradation des différents composants chimiques de nématodes à différents stades de développement (Castaneda-Alvarez and Aballay, 2016). L'application de différents traitements a permis d'améliorer la croissance des porte-greffes de *Citrange Carrizo* et de bigaradier. Cela peut s'expliquer par la production de divers composés régulateurs tels que l'IAA, l'ammoniac, les polysaccharides et la solubilisation du phosphate, qui agissent directement dans la rhizosphère comme des agents de biocontrôle en modifiant les niveaux d'hormones végétales ou en réduisant le potentiel parasitaire des pathogènes (Turatto *et al*., 2018). Parmi les molécules impliquées dans ce mécanisme, on retrouve les sidérophores, l'IAA, les phénazines, les sessilines, les orfamides, les chitinases, les glucanases et les protéases (Dimkić *et al*., 2022).

L'évaluation de l'activité nématicide des antagonistes fongiques a montré que les différents antagonistes sélectionnés possèdent une activité nématicide et ovicide prometteuse vis-à-vis du nématode des agrumes *T. semipenetrans* à la fois *in vitro et in vivo*. En effet, l'activité nématicide la plus élevée a été enregistrée chez *P. lilacinus* et *A. terreus*, avec une activité nématicide supérieure à 93% à une concentration de 10^8 (spores/ml) après 168 h d'incubation. Ces résultats sont en accord avec ceux d'El-Marzoky *et al*. (2023) qui ont montré que la souche de *P. lilacinus* (AUMC 10620) était très efficace pour supprimer les larves de *T. semipenetrans* aux concentrations 1,25, 2,5 et 5×10^7 spores/ml en conditions *in vitro* et *in vivo*. De même, Hanawi (2016) a montré que l'application de *P. lilacinus* a réduit de 50% le nombre de *T. semipenetrans*, infestant l'orange douce. Dans l'étude menée par Walode *et al*. (2008), l'ajout de *P. lilacinus* au sol entourant les citronniers (*Citrus jambhiri*) a entraîné une diminution de 65% des niveaux de juvéniles (J2) et une réduction de 76% du nombre de femelles matures. *P. lilacinus* a été rapporté par de nombreux auteurs comme étant efficace contre d'autres NPP. Par exemple, Sarven *et al*. (2019) ont montré que l'application de *P. lilacinus* à une concentration de 10^6 UFC/g au sol avant et après la transplantation d'aubergine a réduit l'indice des galles racinaires de 72% et les masses d'œufs de *Megalaima incognita* de 84%. De même, Leong *et al*. (2021) ont démontré que dix souches autochtones de *P. lilacinus* présentaient une capacité élevée d'infection (plus de 90%) et de parasitisme des œufs (66% à 78,8%) de *M. incognita*, avec une forte inhibition de l'éclosion des œufs (89%).

L'observation microscopique a révélé que *P. lilacinus* pénètre directement les œufs de *T. semipenetrans* et entre en contact avec les juvéniles. Le parasitisme des nématodes est dû à l'invasion directe de la surface des œufs par les hyphes, qui produisent des appressoriums à la surface, infectant les œufs après adsorption (Chen and Hu, 2021). Au cours de l'infection, *P. lilacinus* sécrète des enzymes, telles que la protéase de sérine et la chitinase, qui dégradent les composants protéiques et chitineux de l'épiderme des nématodes, facilitant l'invasion fongique et la destruction cellulaire. L'étude de l'effet du filtrat de culture de *P. lilacinus* a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans son effet nématicide. En effet, le filtrat a réduit le nombre de juvéniles de *T. semipenetrans* de 100% après 25 jours d'incubation montrant que *P. lilacinus* tue les nématodes avec des toxines avant de les infecter. L'acide acétique et les leucinostatines ont été identifiés comme principaux métabolites toxiques dans les filtrats (La Mondia and Timper, 2016). Un autre mécanisme est la capacité du champignon à induire des mécanismes de défense des plantes contre les nématodes par la production d'éliciteurs qui activent la voie de la résistance systémique acquise (RSA) chez les plantes,

entraînant la production de protéines PR (Elsherbiny *et al.*, 2019)., telles que les chitinases et les β-1,3-glucanases, capables de dégrader les composants de la paroi cellulaire des nématodes, provoquant ainsi leur mort.

Les espèces d'*Aspergillus*, notamment *A. ustus* et *A. terreus*, ont été largement étudiés pour leurs propriétés biologiques. En effet, *A. ustus* a été étudié pour ses propriétés fongicides, notamment pour lutter contre le champignon phytopathogène *F. oxysporum*, responsable de la maladie du flétrissement du poivron (Yahia *et al.*, 2023). Il a également été montré qu'*Aspergillus ustus* peut solubiliser le phosphate, augmenter la biomasse végétale (Gharu et al., 2023) et participer à la bioremédiation des sites/sols contaminés par l'arsenic (Kamal *et al*., 2023). *Aspergillus terreus* a également été étudié pour ses activités antimicrobiennes (Abdelaziz *et al*., 2023), et myco-insecticide (Ragavendran *et al*., 2018). Cependant, les études sur l'effet nématicide d'*A. terreus* et *A. ustrus* sont rares jusqu'à présent. Seule une étude a été réalisée sur *A. terreus*, soutenant ainsi nos résultats. Cette étude a été réalisée par Singh and Mathur (2010). Ils ont montré que le traitement des tomates par *A. terreus* à une concentration de $2,3 \times 10^8$ spores/ml a réduit de 76% et 73% respectivement le nombre d'œufs/masse d'œufs et le nombre d'éclosions d'œufs/masse d'œufs du nématode *Meloidogyne incognita* infestant la tomate. De même, une étude sur *A. ustrus* a été réalisée par Eapen *et al.* (2005), où ils ont signalé sa capacité à parasiter les œufs et les femelles des nématodes à galles *Meloidogyne incognita*. Cependant, jusqu'à présent, aucune étude n'a été réalisée sur l'effet de ce champignon sur le nématode des agrumes *T. semipenetrans*. Néanmoins, nos résultats indiquent que ces deux espèces d'Aspergillus ont une activité nématicide significative contre ce nématode. En effet, une application *in vitro* de ces champignons a révélé une activité nématicide de 93,09% pour *A. terreus* et de 79,27% pour *A. ustrus* à une concentration de 10^8 spores/ml après 168 heures d'incubation. De plus, une inhibition totale de l'éclosion des œufs a été observée aux concentrations de 10^8, 10^7 et 10^6 spores/ml pour *A. terreus* et *A. ustrus*, respectivement. En plus, l'utilisation *in planta* d'*Aspergillus terreus* (OR250916) et d'*Aspergillus ustrus* (OR250163) a permis de réduire la population de *Tylenchulus semipenetrans* de respectivement 94,89% et 85,40% chez *Citrus aurantium*, et 97,14% et 85,94% chez *Citrange Carrizo*. Ces résultats sont en accord avec des études récentes menées par Bhat *et al*. (2023) et Yeon *et al*. (2023), qui ont montré l'effet létal des espèces d'*Aspergillus*, abondantes dans le sol, sur les populations de nématodes, notamment, l'espèce *A. Luchuensis* Hy-6 dans la lutte contre *M. incognita* chez le concombre (Wang *et al*., 2023),

Aspergillus niger Tiegh contre *Meloidogyne incognita* chez la tomate (Özdemir and Arici, 2023) et *A. welwitschiae* contre *Meloidogyne graminicola* chez le riz (Xiang *et al*., 2020).

Les observations microscopiques montrent qu'*Aspergillus terreus* (OR250916) et *Aspergillus ustrus* (OR250163) sont capables de parasiter les œufs de *T. semipenetrans*. En effet, les spores produites par ces champignons adhèrent aux œufs du nématode et pénètrent à l'intérieur, provoquant ainsi la dégradation de leur contenu et la destruction des œufs. Ces champignons peuvent également agir directement sur les nématodes adultes en produisant une variété de métabolites bioactifs, tels que des enzymes (amylase, cellulase, lipase et protéase) (Ahmed *et al*., 2020; Kazeem *et al*., 2021; Popova *et al*., 2021; Yao *et al*., 2022), des peptides (Luo *et al*., 2019), et des composés volatils (Hung and Lee Rutgers, 2016). Ces métabolites peuvent dégrader les tissus des nématodes, perturber leur physiologie et interférer avec leurs processus biologiques.

Suite à la réalisation d'une étude sur l'effet des champignons mycorhiziens sur les nématodes phytoparasites des agrumes, il a été constaté que ces derniers sont négativement corrélés à la densité de nématodes. L'extraction des spores de CMA et leur dénombrement a révélé que les genres *Funneliformis* et *Rhizophagus* sont les plus fréquents dans la rhizosphère des citrus marocains. L'inoculation des porte-greffes d'agrumes *Citrus aurantium* et *Citrange Carrizo,* préalablement infestés par *T. semipenetrans* avec *Funneliformis mossea* a entraîné une réduction significative de la population de *T. semipenetrans* chez les deux porte-greffes d'agrumes. En outre, une augmentation notable de la matière sèche des pousses et des racines a été observée, démontrant ainsi les effets bénéfiques de l'inoculation avec *Funneliformis mosseae* sur la croissance des plantes. Ces constatations sont en accord avec O'Bannon *et al*. (1979) qui a montré que la biomasse des racines, des tiges et des feuilles de *Citrus limon*a a significativement augmenté suite à l'inoculation avec *F. mosseae*. Une autre étude de Chandra *et al*. (2022) a révélé que par rapport aux plantes non mycorhizées, les plantes de sorgho inoculées avec une culture mixte de *F. mosseae* ont mieux poussé et ont produit plus de hauteur de plante et de biomasse sous des sols salins et sodiques. Cela est dû à l'atténuation du stress salin grâce à une plus grande biomasse racinaire, un rapport racine/tige amélioré et un rapport K+/Na+ amélioré. Cela pourrait être le résultat de la manipulation de l'environnement rhizosphériques via les CMA en fournissant une meilleure nutrition en P et une tolérance au stress.

Nos résultats ont également révélé que les plantes inoculées avec *Rhizophagus irrigularis* ont montré une augmentation de la biomasse sèche des racines et des pousses chez

les deux porte-greffes d'agrumes par rapport aux témoins. Ces résultats sont en accord avec ceux de travaux de Essahibi *et al*., (2019), qui ont montré que l'interaction des CMA, tels que *Rhizophagus intraradices*, *Rhizophagus fasciculatus* et *Funneliformis mosseae*, avec le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) améliore l'absorption des nutriments et favorise la croissance de la biomasse végétale, en particulier dans des conditions de faible fertilisation phosphatée. De plus,Essahibi *et al*. (2016) ont démontré que l'inoculation du caroubier par *Funneliformis mosseae*, seul ou en combinaison avec d'autres CMA, améliore l'enracinement et la résistance des boutures aux stress environnementaux. Par ailleurs, Fouad *et al*. (2014) ont mis en évidence les effets protecteurs de *Rhizophagus manihotis* et *Funneliformis mosseae* contre le stress oxydatif induit par la sécheresse chez l'olivier. Ces études mettent en avant la polyvalence des CMA dans l'amélioration globale des performances des cultures, ouvrant ainsi des perspectives prometteuses pour une agriculture plus résiliente et durable.

En ce qui concerne l'essai de biocontrôle de *T. semipenetrans*, il a été constaté que l'infestation des portes greffes d'agrumes par *T. semipenetrans* a été réduite au niveau de racines et de sol après l'inoculation par *Rhizophagus irregularis* et *Funneliformis mossea*. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que l'ajout de CMA modifie la composition des exsudats racinaires, qui servent de signaux de reconnaissance et de pénétration pour les nématodes (Vos *et al*., 2012). Cette modification peut entraîner une perturbation de la communication entre les nématodes et les racines des plantes, limitant ainsi leur capacité à s'établir et à causer des dommages. Les CMA peuvent induire des réponses systémiques dans la plante, activant des mécanismes de défense dans tout le système racinaire, y compris dans les zones où les nématodes tentent de pénétrer. Cette modulation de la réponse de la plante peut inclure des changements dans l'expression des gènes impliqués dans la défense et la régulation de la croissance des racines (Jung *et al.*, 2012).

V. CONCLUSION

Le présent chapitre porte sur l'évaluation de l'effet nématicide des micro-organismes isolés de la rhizosphère des agrumes. De l'ensemble des isolats microbiens (190) testés, cinq espèces bactériennes identifiés comme *Variovorax paradoxus* (OQ651063) (isolat B6'), *Bacillus pseudomycoides* (OQ652044) (isolat B1), *Bacillus simplex* (OQ651985) (isolat BM12), *Bacillus cereus* (OQ651999) (isolat BM7) et *Paracoccus speluncae* (OQ652010) (isolat BR21**)**, et trois espèces fongiques identifiés comme, *Paecilomyces lilacinus* (isolat Bk7), *Aspergillus ustus* (OR250163) (isolat M23) et *Aspergillus terreus* (OR250916) (isolat SBK5),

ont exhibé une activité nématicide prometteuse contre le nématode phytoparasite des agrumes *Tylenchulus semipenetrans* à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Les tests de confrontation *in vitro* ont mis en évidence une importante activité nématicide chez les huit espèces microbiennes (bactéries et champignons) étudiés. Cependant, cette activité nématicide a significativement varié avec les espèces bactériennes et fongiques, leurs concentrations et le temps d'incubation. Le pouvoir nématicide bactérien le plus élevé a été enregistré avec l'inoculation mixte combinant les cinq bactéries ($3,6 \times 10^5$ cellules/ml) qui a provoqué la mort de toutes les juvéniles J2 (taux de mortalité de100%) après 96 h d'incubation. Une performance quasi-similaire (un taux de mortalité de 98,98%) a été enregistrée par *B. cereus*. En outre, tous les traitements bactériens testés ont provoqué une inhibition totale de l'éclosion des œufs, quelle que soit la concentration et la durée d'incubation. En ce qui concerne les champignons, la meilleure activité nématicide contre J2 (taux de mortalité > 93%) a été obtenue avec *Paecilomyces lilacinum* et *Aspergillus terreus* après 168 h d'incubation à une concentration de 10^8 spores/ml. De même, tous les champignons ont provoqué une inhibition totale de l'éclosion des œufs à des concentrations supérieures ou égales à 10^6 spores/ml.

D'autre part, une relation étroite a été mise en évidence entre les cinétiques de croissance bactérienne et fongique et l'activité nématicide des filtrats de leurs milieux de culture liquide. En effet, les activités nématicides maximales des filtrats, généralement atteintes entre le 4ème et le 6ème jour d'incubation chez les bactéries et entre le 20ème et le 23ème jour de culture chez les champignons, coïncidaient avec les pics de croissance correspondant aux biomasses bactériennes et fongiques maximales. Ces résultats suggèrent qu'au cours de leur cycle de croissance normale ces bactéries et champignons produisent des molécules bioactives contre les juvéniles J2 et les œufs de *T. semipenetrans*.

Les résultats des tests de confrontation *in vivo*, chez les porte-greffes d'agrumes *Citrus aurantium* et *Citrange Carrizo*, n'ont pas seulement confirmé le fort potentiel nématicide des champignons et bactéries étudiés, mais ont en plus révélé le rôle de ces microorganismes dans la stimulation de la croissance et la production de biomasse chez ces deux porte-greffes. En effet, en présence de *B. cereus* la population des nématodes a été réduite de plus de 93% dans le sol rhizosphérique et de 85% dans les racines. De même, l'inoculation avec *A. terreus* a réduit la population des nématodes de plus de 94% dans le sol rhizosphérique et de 78% dans les racines. En outre, les plants d'agrumes inoculés avec *F. mosseae* ont montré une croissance et une production de biomasse des pousses respectivement 1,85 et 1,69 fois supérieures à celles

du témoin inoculé uniquement avec *T. semipenetrans*, et de 0,8 et 0,84 fois supérieures à celles du témoin non inoculé.

Ces résultats démontrent que les microorganismes sélectionnés pour leur pouvoir nématicide *in vitro* et *in vivo* contre *T. semipenetrans* offrent des opportunités très importantes dans la mesure où ils peuvent aider au développement de produits biologiques dotés d'un fort potentiel non seulement de protection contre *T. semipenetrans* mais également de stimulation de la croissance des agrumes.

CHAPITRE VI

EVALUATION DU POTENTIEL NEMATICIDE DE CERTAINES PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES

I. INTRODUCTION

De nombreux nématicides chimiques sont utilisés avec succès pour réduire la population de *T. semipenetrans* dans de nombreuses régions productrices d'agrumes de par le monde (Liu *et al*. 2014). Cependant, pour contrôler les populations des NPP et maintenir un rendement satisfaisant, ces nématicides chimiques doivent être appliqués à plusieurs reprises, ce qui représente une menace sérieuse pour l'environnement et la santé des consommateurs. En plus, leur application répétée peut engendrer l'apparition de souches résistantes. Aujourd'hui, la culture des agrumes se retrouve confrontée au double défi, de résoudre les divers problèmes de gestion agronomique (attaques de ravageurs, maladies et problèmes nutritionnels) et de répondre à la tendance croissante à rechercher des fruits aux attributs sensoriels améliorés et exempts de résidus agrochimiques. Pour atteindre ces objectifs, des stratégies de gestion respectueuses de l'environnement doivent être mises en place. Au cours des dernières décennies, de nombreux produits dérivés des plantes ont été étudiés pour leurs propriétés nématicides (Javed *et al*., 2008). Certains d'entre eux, tels que les dérivés des *Brassicaceae* ou de neem (*Azadirachta indica*), ont été transformés en formules nématicides industrielles efficaces (Nile *et al*., 2018). De même, l'effet nématicide des extraits de nombreuses autres espèces de plantes a été testé contre plusieurs genres et espèces des NPP, dont *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp., *Ditylenchus dipsaci*, *Bursaphelenchus xylophilus*, ainsi que les nématodes à kystes *Heterodera* spp. et *Globodera* spp (Avato *et al*., 2017; D'Addabbo *et al*., 2023). Cependant, les données bibliographiques disponibles sur l'effet des extraits de plantes sur le nématode des agrumes *Tylenchulus semipenetrans* restent limitées. Ainsi, la présente étude a pour objectif de, (**i**) évaluer le potentiel nématicide des huiles essentielles et des extraits aqueux de certaines plantes aromatiques et médicinales (PAM), *Rosmarinus officinalis, Laurus nobilis, Verbena officinalis, Foeniculum vulgare, Moringa oleifera, Chamaemelum nobile* et *Thymus vulgaris*, (**ii**) déterminer les profils chimiques de ces plantes par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) et chromatographie à haute performance-spectrométrie de masse (HPLC-MS), et (**iii**) explorer les relations entre la composition chimique de ces huiles essentielles et extraits et leur pouvoir nématicide contre *T. semipenetrans* en termes d'inhibition de l'éclosion des œufs et de mortalité des juvéniles J2.

Dans ce chapitre, nous cherchons à répondre aux questions suivantes : les extraits de PAM (EA/ HEs) peuvent-ils constituer un outil biotechnologique durable pour lutter contre *T. semipenetrans* ? Existe-t-il des variations significatives dans l'efficacité nématicide entre les

différentes plantes testées ? Existe-t-il une relation entre la composition chimique des huiles essentielles et des extraits et leur efficacité nématicide ?

II. MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal

Les plantes aromatiques et médicinales (PAM) utilisées, *Rosmarinus officinalis* (RO), *Thymus vulgaris* (TV), *Laurus nobilis* (LC), *Verbena officinalis* (VO), *Foeniculum vulgare* (FV), *Moringa oleifera* (MO) et *Chamaemelum nobile* (CN), ont été acquises auprès d'un herboriste. (**Tableau 33**).

Les plantes de *Citrus volkameriana* utilisées dans l'essai *In Vivo* nous ont été fournies par la pépinière du domaine Agricole de Kénitra.

Tableau 33. Noms communs et scientifiques, les parties de la plante et la famille de plantes aromatiques et médicinales utilisées.

Nom commun	Nom scientifique	Parties de la plante	Famille	Code
Romarin	*Rosmarinus officinalis*	Feuilles	*Lamiaceae*	RO
Laurier	*Laurus nobilis*	Feuilles	*Lauracées*	LN
Verveine	*Verbena officinalis*	Feuilles	*Verbenaceae*	VO
Fenouil	*Foeniculum vulgare*	Feuilles	*Apiaceae*	FV
Moringa	*Moringa oleifera*	Feuilles	*Moringaceae*	MO
Camomille	*Chamaemelum nobile*	Fleurs	*Asteraceae*	CN
Thym	*Thymus vulgaris*	Feuilles	*Lamiaceae*	TV

2. Préparation de l'inoculum de *T. semipenetrans*

L'inoculum du nématode (œufs et juvéniles J2) a été obtenu à partir des racines d'agrumes infestées (**voir sous-section 2. Chapitre IV**).

3. Extraction des huiles essentielles et détermination de leur composition chimique par GC-MS

Les huiles essentielles (HE) ont été extraites de sept plantes aromatiques et médicinales (PAM), *Rosmarinus officinalis* (RO), *Thymus vulgaris* (TV), *Laurus nobilis* (LC), *Verbena officinalis* (VO), *Foeniculum vulgare* (FV), *Moringa oleifera* (MO) et *Chamaemelum nobile* (CN) (**Tableau 33**). Un échantillon de 150 g de feuilles de chaque PAM a été soumis à une hydro-distillation avec un appareil de type Clevenger pendant 4h. L'étude qualitative et

quantitative de la composition chimique des huiles essentielles a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). L'analyse a été effectuée avec un système Agilent 5977A et un HP-SMSUI (Agilent) (30 m × 0,25 mm, épaisseur de film de 0,25 µm). Les conditions chromatographiques ont été établies de la manière suivante : 20 µl d'huile essentielle diluée dans de l'acétate d'éthyle ont été injectés à une température de 280 °C en utilisant un mode de séparation par fractionnement. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1 ml/min. La température de la colonne a été maintenue à 60 °C pendant 2 minutes, puis augmentée de 60 °C à 320 °C à une vitesse de 20 °C/min. La température du détecteur était fixée à 250 °C. Les spectres de masse ont été obtenus à une énergie d'ionisation de 70 eV, avec une plage de masse allant de 30 à 650 unités arbitraires (u.a) et un taux de balayage de 1 balayage/s. Les composants des huiles essentielles ont été identifiés en comparant leurs spectres de masse avec ceux de la base de données de l'institut national des normes et de la technologie (NIST).

4. Préparation des extraits aqueux des PAM et détermination de leur composition chimique par HPLC-MS

Pour chaque espèce de PAM, *Rosmarinus officinalis* (RO), *Thymus vulgaris* (TV), *Laurus nobilis* (LC), *Verbena officinalis* (VO), *Foeniculum vulgare* (FV), *Moringa oleifera* (MO) et *Chamaemelum nobile* (CM), une quantité (25 g) de poudre (masse sèche) a été placée dans un flacon en verre de 500 ml contenant 250 ml d'eau distillée (Ahmad *et al*., 2010). Les flacons ont été placés sous agitation pendant 4 h à 500 tr/min. Le mélange de chaque flacon a été filtré à travers un entonnoir équipé d'un papier filtre (N°1; 100 µm) et centrifugé pendant 15 min à 1500 tr/min pour éliminer les débris. L'eau de l'extrait aqueux a été évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif à 60 °C. Les reliquats obtenus ont été ensuite récupérés dans 25 ml d'eau distillée. Les solutions obtenues, considérées comme des solutions mères, ont été stockées à 4 °C pour évaluer ultérieurement leurs teneurs en polyphénols et leurs activités nématicides (Babaali *et al*., 2017). Les extraits ont été analysés par chromatographie liquide de haute performance (HPLC-DAD-ESIMS), équipée d'un détecteur à barrettes de diodes et d'une source d'ionisation par électrospray (ESI) pour effectuer une analyse MS/MS. Les composés phénoliques ont été identifiés selon la méthode décrite précédemment par Puigventós *et al*. (2015). L'expérience a été menée sur un Dionex Ultimate 3000 (CA, USA) équipé d'une pompe quaternaire (HPG 3400 RS), d'un échantillonneur automatique (WPS 3000 TSL) et d'un four à colonne (TCC 3000). La méthode proposée utilise une colonne C18 à phase inverse Kinetex (250 4,6 mm, particules de 2,6 m) fournie par Thermo Fisher Scientific (CA, USA). Un gradient

de séparation a été établi à partir du solvant A (solution aqueuse d'acide formique à 0,1%) et du solvant B (méthanol). Le processus commence avec 5% de solvant B et augmente progressivement jusqu'à atteindre 95% de solvant B en 26 minutes. Ensuite, le gradient revient aux conditions initiales à 5% de solvant B à 36 min minutes et reste à ce niveau pendant les dernières minutes de l'analyse. Le débit de la phase mobile était de 1 ml/min. Les données spectrales UV-Vis pour tous les pics ont été accumulées entre 200 et 400 nm, tandis que les profils chromatographiques ont été enregistrés à 280 nm. Le spectromètre de masse était un triple quadrupôle TSQ Endura (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) avec une source d'ionisation par électrospray chauffée (H-ESI) en mode négatif. L'azote (pureté >99.98%) a été utilisé comme gaz de gaine, gaz balayeur d'ions et gaz auxiliaire à des débits de 65 ; 0 et 40 unités arbitraires (u.a). Les températures du vaporisateur H-ESI et du tube de transfert d'ions étaient toutes deux réglées sur 350 °C. La tension d'électro spray était réglée sur 2,5 kV. En Q1 (résolution de masse de 0,7 m/z largeur à mi-hauteur (FWHM)), le mode d'acquisition MS en balayage complet (m/z 50–1000) avec un temps de balayage de 0,5 s a été principalement utilisé pour la caractérisation et l'évaluation des composés présents dans l'échantillon.

5. Activité nématicide in vitro des HEs et des extraits aqueux

Pour évaluer l'effet des HEs et des extraits aqueux des PAM étudiées sur la mortalité des juvéniles de seconde génération (J2) et sur l'éclosion des œufs de *T. semipenetrans*, un volume de 1 ml de suspension aqueuse contenant 50 juvéniles ou 50 œufs (Montasser *et al*., 2012) de *T. semipenetrans* a été distribué à l'aide d'une pipette dans une boîtes de Pétri (3 mm) à laquelle a été ajouté 1 ml d'une solution d'huile essentielle (5, 10, 15 ou 20 µl/ml) ou d'extrait aqueux (1%, 4%, 8%, ou 10%). Les solutions d'huiles essentielles ont été préparées selon la méthode décrite par Mc Donnell *et al*. (2016). Les quantités nécessaires des huiles essentielles (5, 10, 15 et 20 µl/ml) ont été dissoutes dans du Tween 80 à un rapport de 1:2, le Tween 80 étant utilisé comme émulsifiant pour obtenir les concentrations d'huile désirées. Un volume de 1 ml d'eau distillée additionnée d'une solution de Tween 80 à 2% ou d'eau distillée seule ont été utilisées pour les boites témoins. Les boites de Pétri ont été incubées pendant des durées de 24, 48, 72 et 96 heures pour l'étude de leur effet sur les J2 et pendant 48, 96 et 144 h pour leur effet sur l'éclosion des œufs, à une température de 25 ± 2 °C (Ahmad *et al*. 2010). L'expérience a été menée selon un plan complètement aléatoire, avec cinq répétitions pour chaque concentration et chaque durée d'incubation. La mortalité des juvéniles a été surveillée quotidiennement, tandis que l'éclosion des œufs a été vérifiée bi-journalièrement à l'aide d'un

microscope optique. Le pourcentage de mortalité des juvéniles et le pourcentage d'éclosion des œufs dans chaque traitement ont été calculés selon la formule d'Abbott (**voir sous-section 6, a du chapitre V**).

6. Activité nématicide *in vivo*

L'expérimentation a été menée sous serre à la Faculté des Sciences et Techniques (FST) de Marrakech entre août et décembre 2022 (24.7- 44.4°C).

Les plantules de *Citrus volkamariana* âgées d'un an ont été transplantées individuellement dans des pots en plastique contenant environ 6 kg de substrat stérilisé composé de sable, de tourbe et de sol de texture sablo-limoneuse, faible teneur en Carbone organique, et pH légèrement alcalin (pH 7,42) collecté du domaine Benkaboura (31°35'16.1"N 7°44'11.3"O). Chaque pot a été inoculé avec une population initiale de 500 juvéniles de *T. semipenetrans*, dans 4 trous dans le sol autour de la tige des plantules d'agrumes. Deux mois après l'inoculation, les plantules de *Citrus volkameriana* ont été arrosées avec 50 ml d'extraits de différentes espèces de PAM, *Rosmarinus officinalis* (RO), *Thymus vulgaris* (TV), *Laurus nobilis* (LC), *Verbena officinalis* (VO), *Foeniculum vulgare* (FV), *Moringa oleifera* (MO) et *Chamaemelum nobile* (CN), à une concentration de 4% (Montasser *et al*., 2012). Les pots ont été disposés de manière aléatoire. Les plantules non traitées par les extraits de PAM ont servi de témoins. Trois mois après le traitement par les extraits de PAM, les plantules d'agrumes ont été soigneusement retirés du sol et des analyses nématologiques et agronomiques ont été effectuées (**voir sous-section 4, a et 4, b du chapitre IV**).

7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'un logiciel statistique IBM SPSS (Version 25). Les données ont été soumises à une ANOVA pour tester la signifiance des différences entre les traitements. Le test HSD de Tukey à 5% de probabilité ($p < 0,05$) a été utilisé pour évaluer les différences significatives entre les traitements. Les valeurs DL50 et DL90 ont été calculées par analyse PROBIT.

III. RESULTATS

1. Rendement et profils chimiques des huiles essentielles

Le rendement en huiles essentielles a varié significativement ($P < 0,05$) entre les différentes espèces de PAM étudiées, *Rosmarinus officinalis* (RO), *Thymus vulgaris* (TV), *Laurus nobilis* (LC), *Verbena officinalis* (VO), *Foeniculum vulgare* (FV), *Moringa oleifera*

(MO) et *Chamaemelum nobile* (CN). Le rendement en HE le plus élevé a été obtenu chez *T. vulgaris* (3 %), suivi de *R. officinalis* (2,3 %). Tandis que les rendements les plus faibles ont été enregistré chez *L. nobilis* (0,25 %) et *V. officinalis* (0,23 %) (**Tableau 34**).

Les sept huiles essentielles ont présenté des profils chimiques différents et des composants majeurs distincts. Vingt-six constituants volatils ont été identifiés dans l'huile essentielle de *C. nobile*, parmi lesquels les hydrocarbures monoterpéniques et les monoterpènes oxygénés ont constitué la classe la plus prédominante, représentant 50,5 % des constituants de l'huile essentielle. Le 4-propan-2-ylsulfinylbenzaldéhyde (20,47 %) et le cyclohexane méthanol, 4-hydroxy-α, α, 4-triméthyl (13,44 %) étaient les monoterpènes oxygénés les plus abondants.

Concernant l'huile essentielle de *R. officinalis*, onze composants volatils ont été identifiés, parmi lesquels l'eucalyptol (44 %), le camphre (16,9 %) et le myrcène (13,86 %) étaient les plus abondants.

Dans l'huile essentielle de *L. nobilis*, quatorze constituants ont été identifiés, avec le l'eucalyptol (35,82 %), l'acétate d'α-terpinyle (12,35 %), naphtalène (9,14 %), le linalol (9,3 %) et l'α-terpinéol (8,43 %), comme composés les plus représentés.

L'huile essentielle de *V. officinalis* a présenté seize composés identifiés, parmi lesquels le monoterpène oxygéné eucalyptol, les hydrocarbures sesquiterpéniques α-curcumène et le sesquiterpène oxygéné oxyde de caryophyllène, représentant respectivement 38 %, 12,69 % et 8,79 %, étaient les plus abondants.

Dans l'huile essentielle de *F. vulgare*, les phénylpropènes tels que l'anéthole (63,10 %) et le monoterpène monocyclique d-limonène (17,99 %) ont constitué la classe la plus abondante.

Le profil GC-MS de *M. oleifera* reflète la présence de quinze composés contenant un niveau élevé d'acides gras, les plus dominants étant les acides palmitique (37,39 %), linoléique (9,89 %) et stéarique (6,06 %) (**Tableau 34**).

Les principaux composés volatils identifiés dans l'huile essentielle de *T. vulgaris* étaient le carvacrol (72,77 %), le p-cymène (5,80 %), le caryophyllène (4,85 %) et le thymol (3,05 %). D'autres composés moins représentés (< 1%) ont également été détectés dans l'huile essentielle de *T. vulgaris* tels que l'humulène (0,33%) l'α-phellandrène (0,19%), le cyclofenchène (0,19%), le 3-octanol (0,18%), l'α-terpinéol (0,15%).

Tableau 34. Rendement et composition chimique (déterminée par des analyses GC-MS) des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* (RO), *Thymus vulgaris* (TV), *Laurus nobilis* (LC),

Verbena officinalis (VO), *Foeniculum vulgare* (FV), *Moringa oleifera* (MO) et *Chamaemelum nobile* (CN).

			Teneur relative (%)						
Composés	**TR**	**Formule**	***CN***	***RO***	***LN***	**VO**	***FV***	***MO***	***TV***
α-Phellandrene	4,54	$C_{10}H_{16}$	-	-	-	-	-	-	0,18
β-Myrcene	4,62	$C_{10}H_{16}$	-	**13,86**	0,60	-	-	-	-
Cyclofenchene	4,62	$C_{10}H_{16}$	-	-	-	-	0,99	-	0,19
Camphene	4,79	$C_{10}H_{16}$	-	**4,72**	-	-	-	-	-
β-Pinene	5,07	$C_{10}H_{17}$	-	1,15	-	-	-	-	-
1-Adamantanemethanol	5,07	$C_{11}H_{18}O$	-	-	-	3,48	-	-	-
3,6-Heptadien-2-ol, 2,5,5-trimethyl	5,20	$C_{10}H_{18}O$	4,41	-	-	-	-	-	-
methyl 2-ethyl acrylate	5,20	$C_6H_{10}O2$	4,19	-	-	-	-	-	-
3-Octanol	5,22	$C_8H_{18}O$	-	-	-	-	-	-	0,18
β-Cymene	5,51	$C_{10}H_{14}$	-	3,37	-	-	-	-	**5,80**
D-Limonene	5,55	$C_{10}H_{16}$		-	-	-	**17,99**	-	-
Cyclohexanemethanol, 4-hydroxy- α, α,4-trimethyl	5,58	$C_{10}H_{20}O$	**13,44**	-	-	-	-	-	-
Eucalyptol	5,59	$C_{10}H_{18}O$	-	**44,00**	**35,82**	**12,69**	-	-	-
γ-terpinène	5,82	$C_{10}H_{16}$	-	-	-	6,21	-	-	**6,50**
Methyleugenol	5,86	$C_{11}H_{14}O_2$	**5,86**	-	-	-	-	-	-
4-propan-2-y lsulfonylbenzaldehyde	5,87	$C_{10}H_{12}O_2$	**20,47**	-	-	-	-	-	-
Cyclohexyl acrylate	5,87	$C_9H_{14}O_2$	1,60	-	-	-	-	-	-
Fenchone	6,11	$C_{10}H1_6O$	-	-	-	-	1,04	-	-
Linalool	6,17	$C_{10}H_{18}O$	2,81	0,77	**9,30**	-	-	-	-
5-methyl-2-propan-2-ylphenol	6,18	$C_{16}H_{20}O2$	**5,05**	-	-	-	-	-	-
Camphor	6,62	$C_{10}H_{16}O$	0,65	**16,90**	-	1,14	-	-	-
Endo-Borneol	6,79	$C_{10}H_{16}O$	-	5,88	-	-	-	-	-
bornéol	6,86	$C_{10}H_{18}O$	-	-	4,39	-	-	-	-
Linalool acetate	6,87	$C_{12}H_{20}O2$	-	-	-	-	-	-	-
Terpinen-4-ol	6,88	$C_{10}H_{18}O$			-	-	-	-	0,15
α-Terpineol	6,98	$C_{10}H_{18}O$	3,31	3,31	**8,43**	1,99	-	-	0,15
Estragole	7,00	$C_{10}H_{12}O$	-	-	-	-	2,95	-	-

Fenchyl acetate	7,29	$C_{12}H_{20}O$	-	-	-	-	2,08	-	-
Benzaldehyde	7,36	C_7H_6O	-	-	-		4,32	-	-
α-Curcumene	7,37	$C_{15}H_{22}$	-	-	-	**38**	-	-	-
Dicyclohexyl disulfide	7,55	$C_{12}H_{22}S_2$	-	-	-	2.12	-	-	-
Thymol	7,67	$C_{10}H_{14}O$	-	-	-		-	-	**3.05**
Bornyl acetate	7,68	$C_{12}H_{20}O_2$	-		1.19		-	-	-
trans-anethole	7,69	$C_{10}H_{12}O$	-	-	-		**63,10**	-	-
verbenone	7,72	$C_{10}H_{14}O$	-		-	2,42	-	-	-
Carvacrol	7,76	$C_{10}H_{14}O$	-	-	-		-	-	**72,77**
α-Terpinyl acetate	8,11	$C_{12}H_{20}O$	-	-	**12,35**		-	-	-
Eugenol	8,23	$C_{10}H_{12}O_2$	1,03	-	1,03		-	-	-
α-Bourbonene	8,45	$C_{15}H$	-	-	-	0,68	-	-	-
β-caryophyllène	8,70	$C_{15}H_{24}$	1,17	0,76	-	1,75	-	-	**4,85**
α-Copaene	8,81	$C_{15}H_{24}$	**5,05**	-	-		-	-	-
Cuparene	9,03	$C_{15}H_{22}$	-	-	-	**6,28**	-	-	-
Farnesene	9,04	$C_{15}H_{24}$	2,40	-	-		0,94	-	-
Naphthalene	9,14	$C_{10}H_8$	-	-	**9,14**		-	-	-
Cubebol	9,29	$C_{15}H_{26}O$	-	-	-	0,85	-	-	-
3,4-Diethoxytoluene	9,46	$C_{11}H_{16}O_2$	-	-	-		-	0,52	-
Formic acid	9,50	CH_2O_2	1,55	-	-	**6,05**	-	-	-
Butylated hydroxytoluene	9,70	$C_{15}H_{24}O$	-		-		-	-	-
Caryophyllene oxide	9,76	$C_{15}H_{24}O$	**8,36**	-	-	**8,79**	-	-	0,70
Ethyl linolenate	9,83	$C_{20}H_{36}O_2$	1,74	-	-		-	-	-
Himachalene	10,02	$C_{15}H_{24}$	2,59	-	-	0,90	-	-	-
Cembrene	10,02	$C_{20}H_{32}$	**5,20**	-	-	-		-	-
Pyrulic acid	10,05	$C_3H_4O_3$	-	-	-	-	-	-	-
1-Heptatriacotanol	11,05	$C_{37}H_{76}O$	0,88	-	-	-	-	-	-
m-Cymene	11,05	$C_{10}H_{14}$	3,92	-	-	-	-	-	-
Isocaryophyllene	10,17	$C_{15}H$	1,54	-	-	-		-	-
Cyclodecyne	10,17	$C_{10}H_{14}O$	3,31	-	-	-	-	-	-
Myristic acid	11,01	$C_{14}H_{28}O_2$	-	-	-	-	-	1,70	-
Hexadecanoic acid	11,60	$C_{16}H_{32}O_2$	-	-	-	-	-	3,75	-

Palmitic Acid	11,99	$C_{16}H_{32}O_2$	1,34	-	-	-	-	**37,39**	-
Linoleic acid, methyl ester	12,26	$C_{19}H_{34}O_2$	-	-	-	-	-	**9,89**	-
Oleic Acid	12,47	$C_{18}H_{34}O_2$	-		-	-	-	3,51	-
Petroselinic acid	12,81	$C_{18}H_{34}O_2$	-	-	-	-	-	5,23	-
Stearic acid	12,88	$C_{18}H_{36}O_2$	-	-	-	-	-	**6,06**	-
Octacosane	13,14	$C_{28}H_{58}$	1,42	-	-	-	-	-	-
Cholestan-3-one, cyclic 1,2-ethanediyl acetal	13,44	$C_{29}H_{50}O_2$	-	-	-	-	-	0,60	-
2,3-Diphenylcyclopropyl methyl phenyl sulfoxide	13,96	$C_{22}H_{20}S$	-	-	-	-	-	**16,74**	-
Pentacosane	13,96	$C_{25}H_{52}$	0,81		-	-	-	-	-
Thiocarbamic acid	14,39	CH_3NO_2	-	-	-	-	-	1,37	-
Erucylamide	15,24	$C_{22}H_{43}NO$	-	-	-	-	-	0,62	-
Eicosatriynoic acid	18,68	$C_{18}H_{32}O_2$	-	-	-	-	-	1,08	-
1,4-diphenyl-2-butene	24,48	$C_{16}H_{16}O$	-	-	-	-	-	0,96	-
Rendement (%)			**0,5**	**2,3**	**0,25**	**0,23**	**1,09**	**1,22**	**3**

2. Activité nématicide des HEs contre *T. semipenetrans*

a. Effet des HEs sur la mortalité des juvéniles J2

Les résultats de l'activité nématicide des sept huiles essentielles (HE) sont présentés dans le **Tableau 35**. L'efficacité nématicide a varié significativement en fonction de la composition chimique ($P < 0,0001$), de la concentration des HE ($P < 0,0001$), et de la durée d'incubation ($P < 0,001$). Les HEs de toutes les plantes aromatiques et médicinales (PAM) étudiées ont démontré une forte activité nématicide contre *T. semipenetrans*, en termes de mortalité des J2 (**Figure 42)**. À une faible concentration en HE (5 µl/ml), le taux de mortalité des juvéniles a varié entre 5 et 23 % après 24 h d'incubation, et a dépassé 60 % après 96 h d'incubation. Cependant, à une concentration élevée en HE (20 µl/ml), la mortalité des juvéniles a atteint 100 % après 96 h d'incubation (**Tableau 35**). Le taux de mortalité de juvéniles a varié selon les espèces de PAM. En effet, *R. officinalis* et *T. vulgaris* ont été particulièrement plus actives contre les juvéniles de *T. semipenetrans*, avec plus de 23 % de mortalité des nématodes à 5 µl/ml après 24 h d'incubation (**Tableau 35**) et 100 % de mortalité après 96 h d'exposition à 10 µl/ml, ou après 72 h d'incubation à 15 µl/ml. Les HE de *V. officinalis, M. oleifera* et *C. nobile* ont montré des taux modérés de mortalité, en particulier à faibles concentrations en HE et pendant les courtes périodes d'incubation.

Tableau 35. Pourcentage de mortalité des juvéniles de deuxième stade (J2) de *Tylenchulus semipenetrans* après incubation dans l'huile essentielle de plantes aromatiques et médicinales, *Rosmarinus officinalis, Thymus vulgaris, Laurus nobilis, Verbena officinalis*, *Foeniculum vulgare, Moringa oleifera* et *Chamaemelum nobile* à 5, 10,15 et 20 µl/ml pendant 24, 48, 72 et 96 heures.

	Concentration (µl/ml)	Période d'incubation (h)			
		24	48	72	96
Rosmarinus officinalis	5	23,81 ± 1,52^{hi}	46,8± 0,58^{d}	69,39 ± 0,23^{d}	87,1 ± 3,84^{bc}
	10	34,24 ± 0,58^{gh}	70,40 ± 0,58^{c}	88,25 ± 1,88^{bc}	100^{a}
	15	52,72 ± 0,33^{ef}	90,81± 0,58^{ab}	100^{a}	100^{a}
	20	35,05 ± 1,70^{g}	98,22 ± 0, 88^{ab}	100^{a}	100^{a}
Laurus nobilis	5	9,52 ± 0,27^{k}	34,04 ± 5,15^{g}	58,50 ± 1,20^{de}	72,17 ± 0,58^{d}
	10	21,23 ± 2,67^{hi}	46,94 ± 0,58^{fg}	72,53 ± 0,67^{d}	96 ± 0,88^{b}
	15	31,23 ± 1,20^{h}	76,53 ± 0,58^{d}	90,53 ± 0,20^{b}	100^{a}
	20	41,84 ± 1,4^{fg}	89,46 ± 0,88^{bc}	100^{a}	100^{a}
Verbena officinalis	5	5,44 ± 0,98^{l}	28,01± 0,88^{h}	63,06 ± 4,08^{de}	66,53 ± 5,67^{de}
	10	11,64 ± 0,58^{j}	47,98 ± 1,54^{f}	69,32 ± 1,58^{de}	91,6± 0,88^{ab}
	15	19,95 ± 1,20^{hij}	65,31 ± 2,08^{de}	76,14 ± 0,63^{d}	100^{a}
	20	31,63 ± 0,94^{h}	69,39 ± 0,58^{de}	88,64 ± 0,58^{c}	100^{a}
Foeniculum vulgare	5	13,61 ± 1,76^{j}	38,65 ± 1,20^{g}	63,95 ± 0,88^{de}	83,87 ± 0,20^{c}
	10	26,37 ± 0,28^{hi}	57,81± 1,88^{de}	71,96 ± 1,45^{d}	96,76 ± 3,58^{ab}
	15	39,80 ± 0,58^{g}	70,41 ± 0,58^{d}	85,22 ± 0,58^{bc}	100^{a}
	20	49,66 ± 0,98^{f}	77,89 ± 0 ,88^{cd}	88,64 ± 2,36^{bc}	100^{a}
Moringa oleifera	5	5,78 ± 0,72^{l}	13,48 ± 2,01^{j}	39,59 ± 0,58^{g}	60,89 ± 4,67^{d}
	10	9,59 ± 0,58^{k}	30,62 ± 0,88^{h}	57,58 ± 1,45^{e}	83,06 ± 1,45^{c}
	15	22,79 ± 0,33^{i}	60,54 ± 0,62^{def}	73,86 ± 0,58^{d}	100^{a}
	20	35,03 ± 4,19^{g}	69,04 ± 1,33^{de}	85,61 ± 1,45^{bc}	100^{a}
Chamaemelum nobile	5	11,9 ± 0,88^{j}	22,70 ± 1,88^{i}	46,60 ± 0,88^{fg}	66,12 ± 0,58^{de}
	10	21,92 ± 0,51^{i}	55,10 ± 4,58^{ef}	67,04 ± 0,88^{de}	87,2 ± 0,20^{bc}
	15	30,61 ± 0,38^{h}	63,26 ± 4,05^{de}	76,89 ± 0,67^{cd}	100^{a}
	20	38,76 ± 0,47^{g}	81,97± 0,88^{c}	95,07 ± 0,88^{ab}	100^{a}
Thymus vulgaris	5	23,47 ± 0,58^{i}	40,78 ± 6,88^{fg}	71,76 ± 0,20^{d}	90,73 ± 3,20^{b}
	10	35,95 ± 0,88^{gh}	78,58 ± 0,58^{cd}	92,04 ± 0, 73^{ab}	100^{a}
	15	56,80 ± 0, 88^{ef}	96,26± 0,88^{b}	100^{a}	100^{a}
	20	81,29 ± 0,5^{c}	100^{a}	100^{a}	100^{a}
ED		1±0,00^{m}	1,2±0,03^{m}	11± 0,00^{j}	13,6 ±0,71^{j}
ED + Tween 80		1,9± 1,03^{m}	2,2± 0,53^{m}	11,7±0,13^{m}	14 ±0,00^{j}

Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

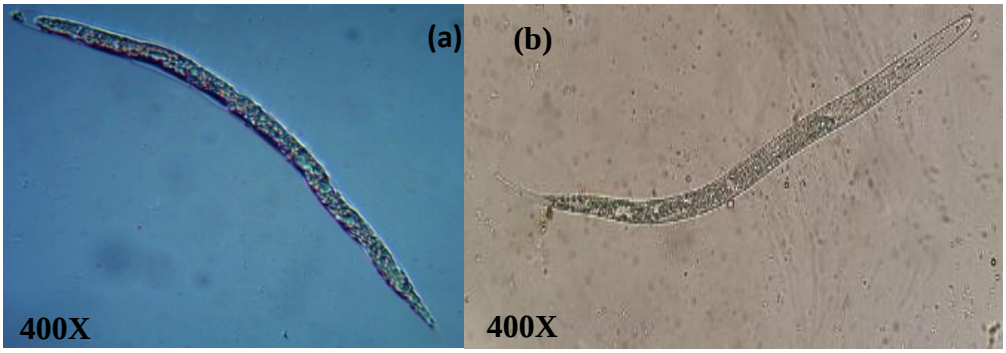


Figure 42. Aspect de *T. semipenetrans* traité par l'huile essentielle de Romarin (a) et non traité (témoin) (b).

b. Dose létale à 50 % (DL50) et 90 % (DL90) des HEs

Les huiles essentielles (HEs) testées pour leur effet sur la mortalité de *T. semipenetrans* (**Figure 42**) ont été évaluées pour leur concentration létale à 50% (DL50) et 90% (DL90) (**Tableau 36**). Le premier jour d'exposition aux traitements, la DL50 a varié entre 4,72 µl/ml pour l'HE de *Thymus vulgaris* et 13,52 µl/ml pour l'HE de *M. oleifera*, tandis que les valeurs de la DL90 ont varié entre 13,471 µl/ml pour *T. vulgaris* et 23,283 µl/ml pour *V. officinalis*. Les HEs de *T. vulgaris* et *R. officinalis* ont montré les valeurs les plus basses, respectivement 4,72 µl/ml et 5,98 µl/ml pour DL50 et 13,47 µl/ml et 13,52 µl/ml pour DL90 (**Tableau 36**). Il n'a pas été possible de calculer les valeurs de DL50 et DL90 pour *T. vulgaris* après 48 h, pour *R. officinalis* après 72 h et pour toutes les autres PAM après 96 h puisque le taux de mortalité a été de 100%.

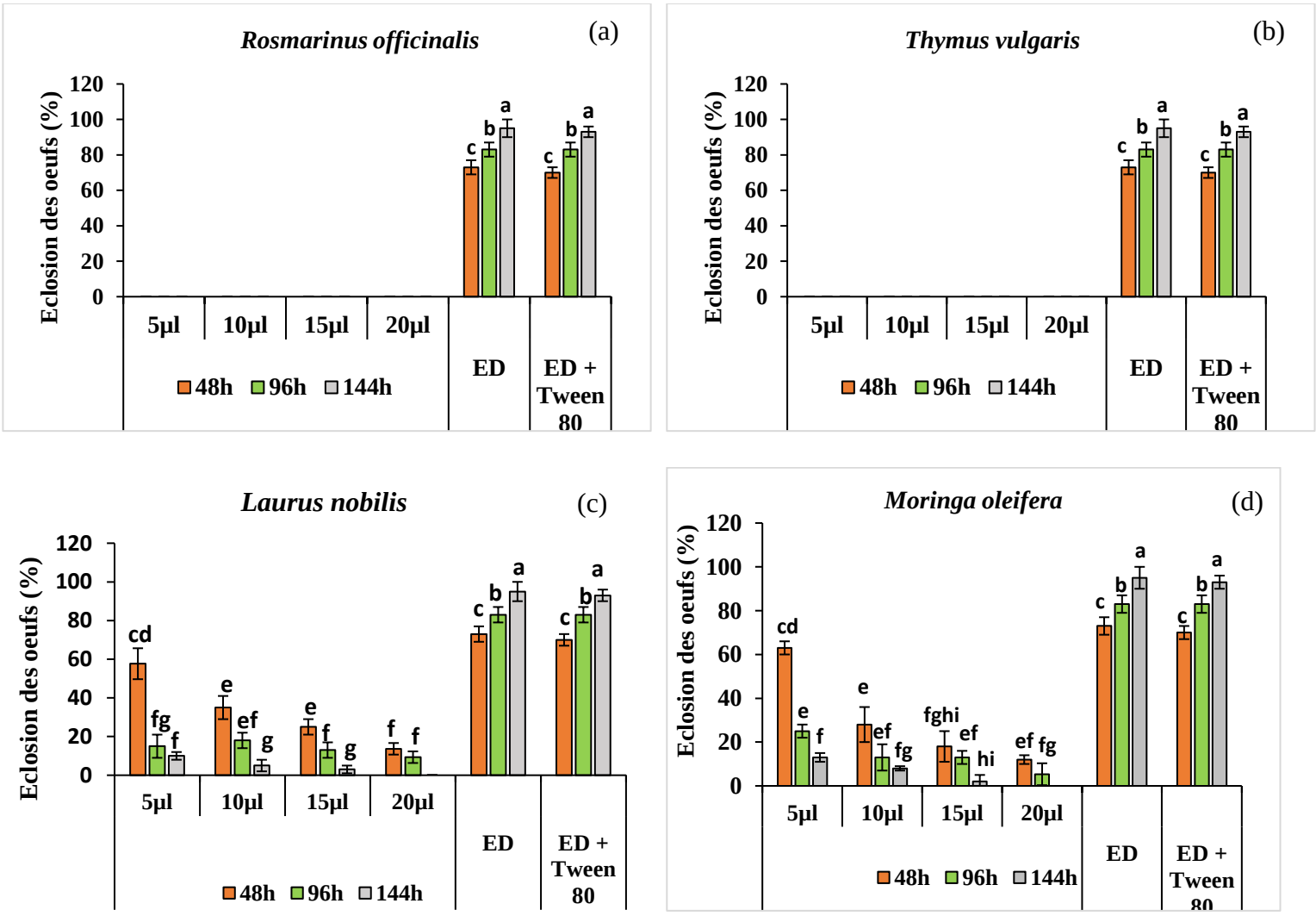
Tableau 36. Doses létales de *T. semipenetrans* à 50% (DL50) et à 90% (DL90) des HEs des espèces de PAM étudiées.

	DL_{50} (µl/ml)*				**DL_{90} (µl/ml)****			
	24h	**48h**	**72h**	**96h**	**24h**	**48h**	**72h**	**96h**
Rosmarinus officinalis	5,980	2,595	-	-	13,519	9,496	-	-
Laurus nobilis	8,579	4,232	3,595	-	15,774	10,264	10.431	-
Verbena officinalis	13,126	8,832	9,278	-	23,283	17,013	14,263	-
Foeniculum vulgare	9,597	5,901	4,934	-	20,428	13,803	11,367	-
Moringa oleifera	13,519	8,831	5,9	-	21,618	18,446	10,496	-
Chamaemelum nobile	10,804	6,675	4,232	-	17,675	11,841	7,965	-
Thymus vulgaris	4,718	-	-	-	13,471	-	-	-

* la dose qui provoque la mort de 50% de la population testée
** la dose qui provoque la mort de 90% de la population testée

c. Effet des HEs sur l'éclosion des œufs

L'analyse de variance a montré que, comparé au témoin, l'éclosion des œufs de *T. semipenetrans* a été significativement réduite par tous les traitements, quelle que soit la concentration (P<0,0001) en HE et la durée d'incubation (P<0,0001). De même, l'inhibition de l'éclosion des œufs a significativement (P < 0,0001) varié entre les espèces de PAM. En effet, l'éclosion des œufs a été complètement inhibée après 48h d'incubation dans les HE de *R. officinalis* et *T. vulgaris*, quelle que soit la concentration en HE et la durée d'incubation (**Figure 43**). Pour les HE des cinq autres PAM, l'éclosion des œufs a diminué avec l'augmentions de la concentration en HE et de la durée d'incubation. Une inhibition complète de l'éclosion des œufs a été obtenue après 144h d'incubation à la concentration de 20 µl/ml (**Figure 43**).



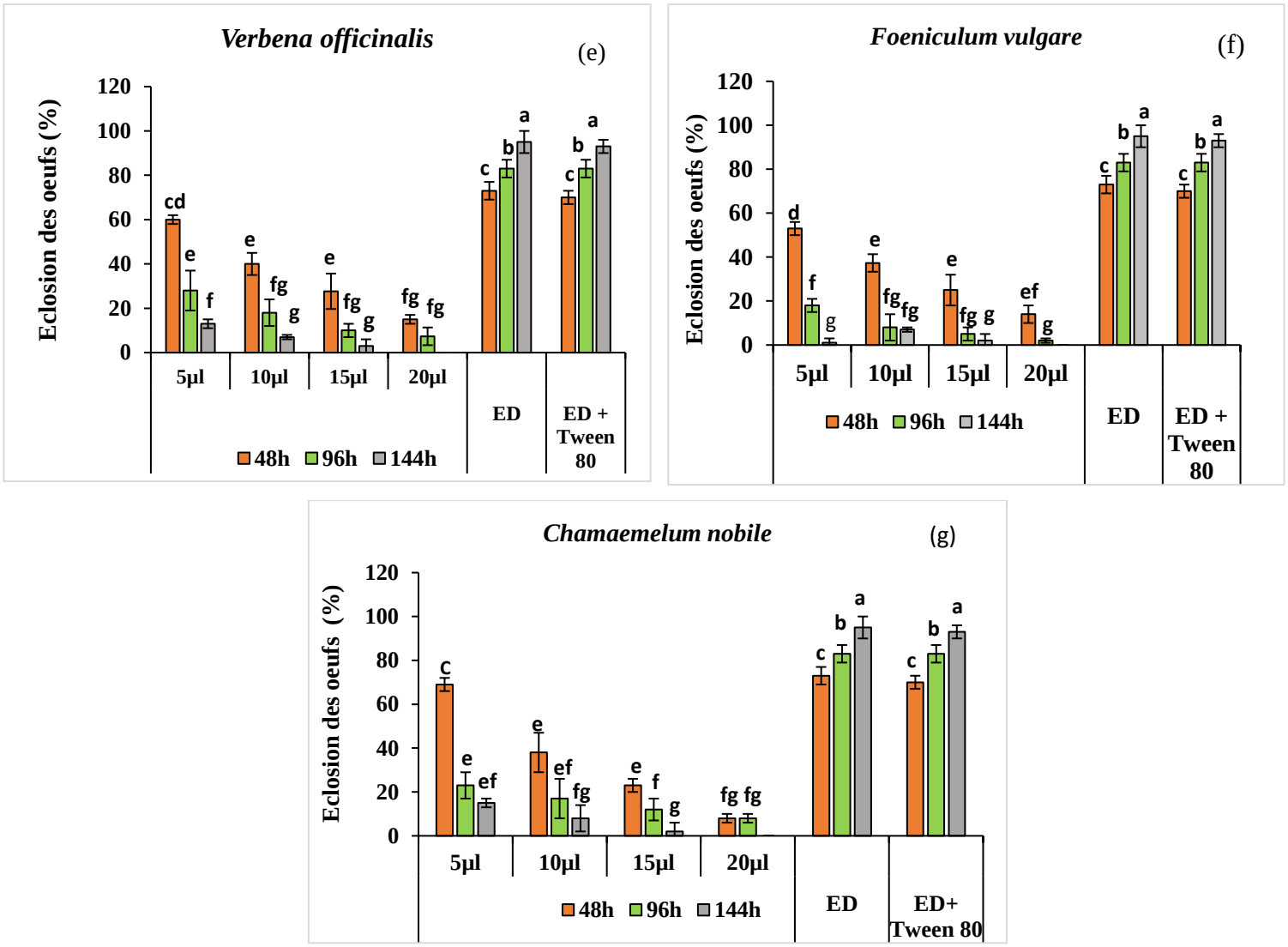


Figure 43. Éclosion des œufs de *Tylenchulus semipenetrans* après 48, 96 et 144 heures d'exposition aux huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales, *Rosmarinus officinalis* (a), *Thymus vulgaris* (b), *Laurus nobilis* (c), *Moringa oleifera* (d), *Verbena officinalis* (e) *Foeniculum vulgare* (f) *et Chamaemelum nobile* (g) à des concentrations de 5, 10, 15 et 20 µl/ml. Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

3. Composition chimique des extraits aqueux

Les extraits aqueux de *R. officinalis*, *L. nobilis*, *V. officinalis*, *F. vulgare*, *M. oleifera* et *C. nobile* ont été analysés par UHPLC/DAD/ESI-MS. Les résultats montrent que chaque plante présente un profil polyphénolique distinct, sans similitude notable en termes de types et de quantités de polyphénols présents (**Tableaux 37 à 42**).

Le chromatogramme UHPLC/DAD/ESI-MS de l'extrait de *R. officinalis* (**Figure 44**) a montré une grande diversité en composés polyphénoliques, avec la présence de quatre sous-

groupes : les composés phénoliques (Rosmaridiphenol (Pic 1), acide carnosique (Pic 12)), les diterpènes phénoliques (Carnosol (Pic 12)), les flavonoïdes glycosylés (6-hydroxylutéoline-7-hexoside (Pic 4), Apigénine-7-o-rutinoside (Pic 5), Homoplantaginine (Pic 8)), les flavonoïdes (Hispiduline (Pic 15)), les flavones (Cirsimartine (Pic 6)) et les flavones glycosylées (Cirsimartine 4'-glucoside (Pic 9)). L'acide carnosique (20,66 %) est le composé majoritaire de l'extrait aqueux du romarin, suivi de la Cirsimartine 4 '-glucoside (8,34 %) et de la Cirsimartine (7,07 %) (**Tableau 37**).

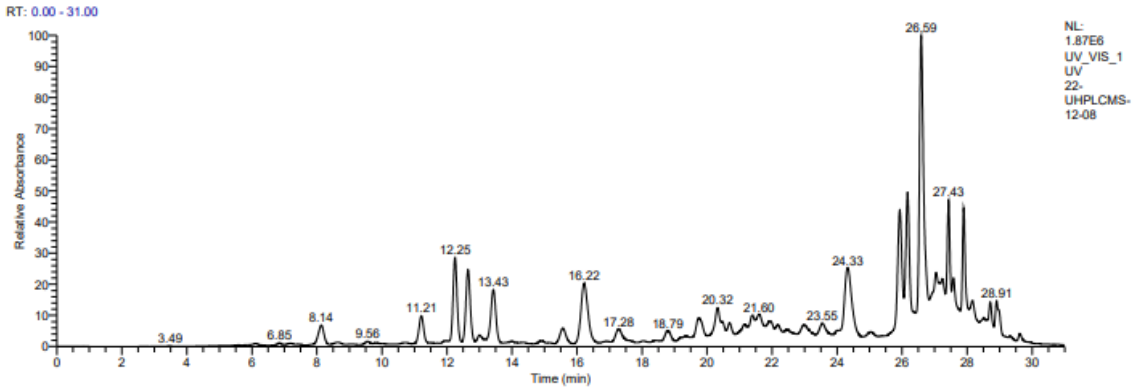


Figure 44. Chromatogramme HPLC de l'extrait de *R. officinalis*

Tableau 37. Identification et quantification des composés phénoliques de *R. officinalis* par analyse HPLC-DAD-ESI-MS.

N	Tr (min)[a]	λmax (nm)	[M-H]$^-$ [1](m/z)	MW (m/z) [b]	Romarin (%)	Composés	Références
1	8, 14	260	315	315,20	2, 01	Rosmaridiphenol	Borrás-Linares *et al*., (2014)
2	11, 21	256	358	-	2, 33	Unknown	-
3	12, 25	261	387, 2	-	6, 13	Unknow	-
4	12, 65	325	463, 52	463,08	5, 58	6-hydroxyluteolin-7-hexoside	Borrás-Linares et al., (2014)
5	13, 43	277, 342	578, 60	578,52	4, 84	Apigenin-7-o-rutinoside	Mena *et al*., (2016)
6	16, 22	310	313, 1	313,07	7, 07	Cirsimartin	Borrás Linares *et al*., (2011)
7	19, 74	269	374, 1	374,90	2, 12	Unkown	-
8	20, 32	382, 334	461, 1	461,10	2, 33	Homoplantaginin	Borrás-Linares *et al*., (2014)
9	24, 33	269, 341	477, 1	477,14	8, 34	Cirsimartin 4'-glucoside	Borrás Linares *et al*., (2011)
10	25, 93	288, 338	503, 2	-	8, 18	Unknown	-
11	26, 17	270, 339	283, 9	-	7, 68	Unknown	-
12	26, 59	269, 344	331, 01	331,19	20, 66	Acide carnosique	Borrás Linares *et al*., (2011)
13	27, 03	275, 328	357, 4	-	3, 76	Unknown	-
14	27,43	273, 332	387, 2	-	5, 56	Unknown	-
15	27, 90	275, 336	299, 07	299,07	4, 99	Hispidulin	Borrás Linares *et al*., (2011)
16	28, 91	272, 336	329, 2	329,18	2, 26	Carnosol	Borrás Linares *et al*., (2011)

Les composés phénoliques de l'extrait aqueux de *F. vulgare* sont principalement des flavonoïdes (Quercétine (Pic 2), Sinensétine (Pic 9)), des flavonoïdes glycosylés (Quercétine-acétyl-glycoside (Pic 6)), des acides phénoliques (Acide caféique 4-O-glucoside (Pic 10)), des dihydrochalcones (DHC) (Phlorétine 2'-O-xylosyl-glucoside (Pic 12)) et un dérivé de l'oléuropéine (3,4-DHPEA-EA (Pic 5)) (**Figure 45**). La Quercétine est le composé majoritaire (65,85 %) (**Tableau 38**).

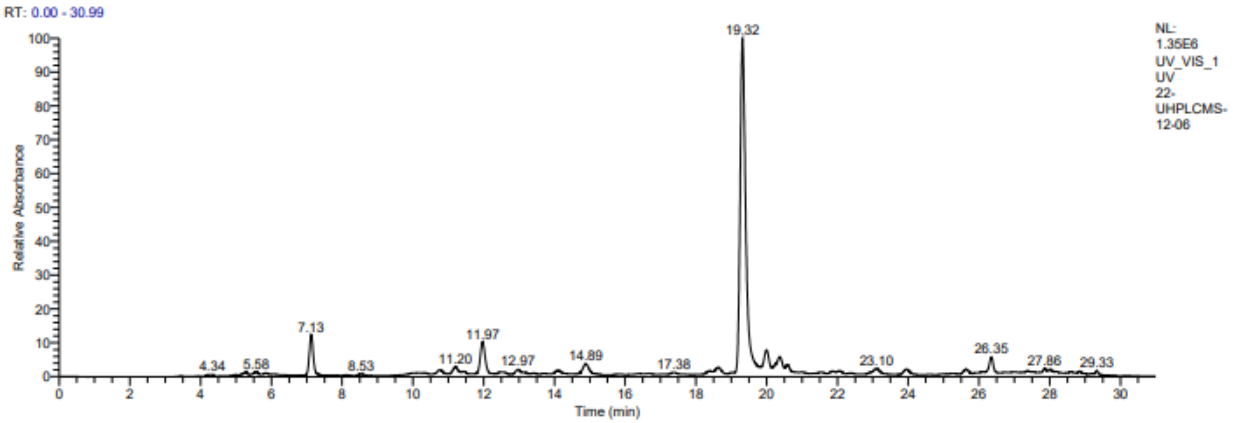


Figure 45. Chromatogramme HPLC de l'extrait de *F. vulgare.*

Tableau 38. Identification et quantification des composés phénoliques de *F. vulgare* par analyse HPLC-DAD-ESI-MS.

N	Tr (min)[a]	λmax (nm)	$[M-H]^{-1}$ (m/z)	MW (m/z)[b]	Fennel (%)	Composés	Références
1	7, 13	210	381, 2	381, 2	6, 06	Unknown	-
2	11, 20	230	301	301	5, 82	Quercetin	Parejo *et al.*(2004)
5	12, 97	250	379	378, 4	0, 88	3,4-DHPEA-EA	Parejo *et al.*(2004)
6	14, 89	222	300, 9	301	2, 55	Quercetin-acetyl-glycoside	Parejo *et al.*(2004)
7	18, 63	210	311	-	1, 45	Unknown	-
8	19, 32	210	301	302, 23	65, 85	Quercetin	Parejo *et al.*(2004)
9	20	256	370, 1	371	2, 80	Sinensetin	Parejo *et al.*(2004)
10	23, 11	200	340, 4	341	1, 54	Acide caféique 4-O-glucoside	Parejo *et al.*(2004)
11	23, 95	200	299	-	1, 22	Unknown	-
12	29, 33	210	369, 3	369, 9	048	Phloretin 2'-O-xylosyl-glucoside	Parejo *et al.*(2004)

Le chromatogramme de l'extrait aqueux de *C. nobile* montre une abondance d'acides phénoliques, tels que l'acide ellagique (Pic 2), l'acide p-coumaroylquinic B (Pic 5), l'acide chlorogénique (Pic 9) et l'acide salvianolique B Isomère A (Pic 12) (**Figure 46**). Les composés majoritaires sont l'acide p-coumaroylquinic B (Pic 5), qui représente 50,92 % des composés phénoliques, et l'acide chlorogénique (Pic 9), qui représente 8,52 % des composés phénoliques. D'autres composés notables sont le flavonol Rhamnétine (Pic 1), qui représente 6,14 % des composés phénoliques, et l'Acide ellagique (Pic 2), qui représente 4,66 % des composés phénoliques (**Tableau 39**).

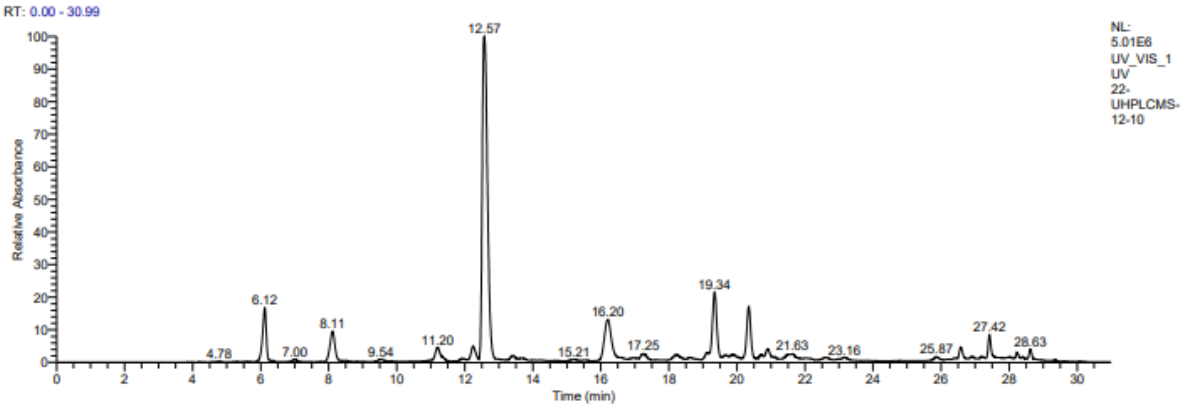


Figure 46. Chromatogramme HPLC de l'extrait de *C. nobile*

Tableau 39. Identification et quantification des composés phénoliques de *C. nobile* par analyse HPLC-DAD-ESI-MS

N	Tr (min)[a]	λmax (nm)	[M-H]$^-$ [1](m/z)	MW (m/z) [b]	Camomille (%)	Composés	Références
1	6, 12	272	315, 2	315	6, 14	Rhamnetin	Šibul *et al*., (2019)
2	8, 11	260, 294	301, 1	301	4, 66	Acide ellagique	Šibul *et al*., (2019)
3	11, 20	255	375, 1	-	2, 38	Unknown	-
4	12, 24	261	579, 1	579	1, 66	Naringin	Šibul *et al*., (2019)
5	12, 57	251	338, 0	338	50, 92	Acide p-coumaroylquinic B	Šibul *et al*., (2019)
6	16, 20	310	607, 5	-	8, 01	Unknown	-
7	17, 25	297	449, 2	-	1, 07	Unknown	-
8	18, 23	313	633, 3	-	1, 18	Unknown	-
9	19, 34	329	354, 1	354	8, 52	Acide chlorogénique	Šibul *et al*., (2019)
10	20, 35	313	529, 3	-	6, 25	Unknown	-
11	20, 90	315	432, 2	432	1, 28	Apigenin glucoside	-
12	26, 58	350	718, 4	718	1, 31	Acide salvianolique B Isomère A	Taamalli *et al*. (2015)
13	27, 42	268, 332	328, 3	328	2,18	Acide trihydroxyoctadécadiénoïque	Taamalli *et al*. (2016)

L'analyse UHPLC/DAD/ESI-MS de l'extrait aqueux de *V. officinalis* révèle une forte présence de flavones glycosylées, notamment l'Apigénine 7-O-glucoside (Pic 6), la Scutellaréine 7-O-diglucuronide (Pic 7) et la Pédalitine 6-O-diglucuronide (Pic 10) (**Figure 47**). Les composés les plus abondants sont l'Iridoïde Aucubine (Pic 11), qui représente 15,85 % des composés phénoliques, et le Phényléthane glycoside Verbascoside (Pic 8), qui représente 9,63 % des composés phénoliques (18,66 %) (**Tableau 40**).

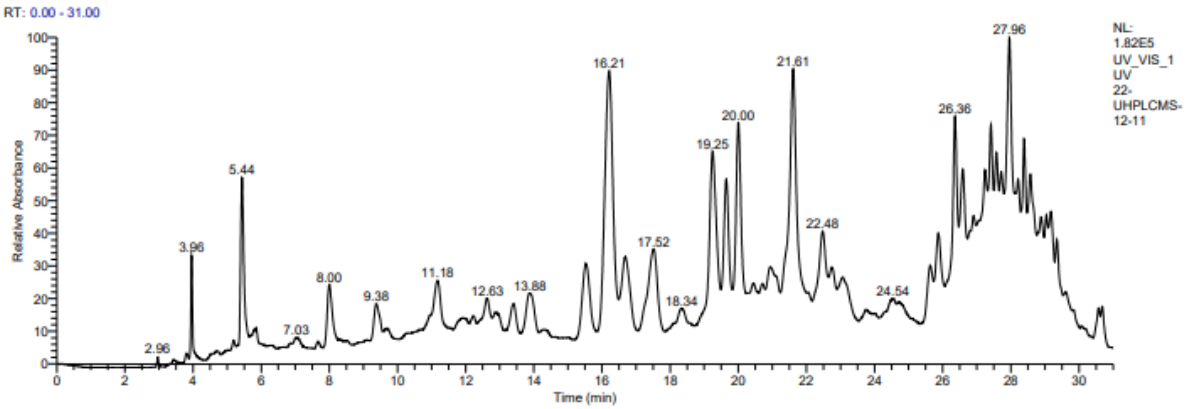


Figure 47. Chromatogramme HPLC de l'extrait de *V. officinalis*

Tableau 40. Identification et quantification des composés phénoliques de *V. officinalis* par analyse HPLC-DAD-ESI-MS.

N	Tr (min)[a]	λmax (nm)	$[M-H]^{-1}$ (m/z)	MW (m/z)[b]	Verveine (%)	Composés	Références
1	3, 96	208	271	271	1, 78	Apigenin	Rehecho *et al*. (2011)
2	5, 44	264	478, 2	-	4, 85	Unknown	-
3	8, 00	255	773, 4	-	2, 96	Unknown	-
4	15, 53	266	405	405	4, 54	Hastatoside	Rehecho *et al*. (2011)
5	16, 21	310	327	-	12,19	Unknown	-
6	16, 69	314	434	434	3, 29	Apigenin 7-*O*-glucosid	Rehecho *et al*. (2011)
7	17, 52	344	639	639	6, 19	Scutellarein 7-*O*-diglucuronide	Rehecho *et al*.(2011)
8	19, 25	267,333	623	623	9, 63	Verbascoside	Bilia *et al*. (2008)
9	19, 65	276	564	-	5, 45	Unknown	-
10	20, 00	345	669	669	7, 18	Pedalitin 6-*O*-diglucuronide	Rehecho *et al*.(2011)
11	21, 61	302	347	347	15, 85	Aucubin	Rehecho *et al*. (2011)
12	22, 48	288	785	-	3, 47	Unknown	-
13	26, 36	269	286	286	4, 63	Luteolin	Bilia *et al*. (2008)
14	27, 96	339	525	-	5, 29	Unknown	-

Le chromatogramme de l'extrait aqueux de *L. nobilis* montre la présence de composés polyphénoliques (**Figure 48**), avec quatre sous-classes : les flavonols (Kaempférol (Pic 1),

Quercétine (Pics 8 à 11), Quercétine aglycone déprotonée (Pic 12)), les flavones (Lutéoline (Pic 15)), les flavones glycosylées (Apigénine 6-C-glucoside (Pic 7)) et les flavanols (Épicatéchine (Pics 1 à 4)). L'Épicatéchine (Pic 2), qui représente 12,61 % des composés phénoliques, est le composé majoritaire dans cet extrait (**Tableau 41**).

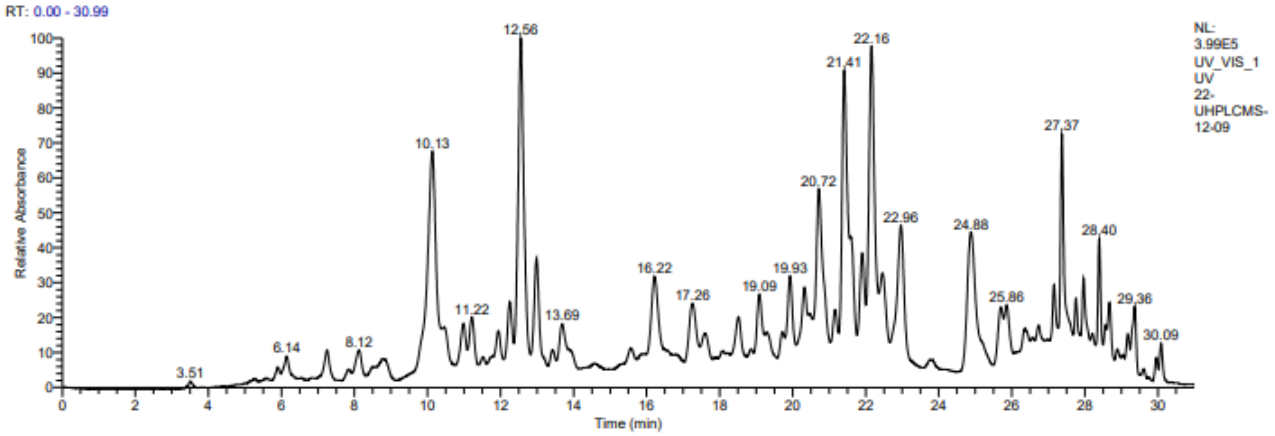


Figure 48. Chromatogramme HPLC de l'extrait de *L. nobilis*.

Tableau 41. Identification et quantification des composés phénoliques de *L. nobilis* par analyse HPLC-DAD-ESI-MS.

N	Tr (min)a	λmax (nm)	[M-H]-1(m/z)	MW (m/z) b	Laurier (%)	Composés	Références
1	10, 13	220	289, 1	290, 2	11, 91	epicatechin	Alejo-Armijo *et al*(2019)
2	12, 56	209	289, 1	290, 2	12, 61	epicatechin	Hasegawa *et al.*(2020)
3	12, 99	276	289, 2	290, 2	3, 30	epicatechin	Hasegawa *et al.*(2020)
4	16, 22	310	289, 3	290, 3	4, 09	epicatechin	Hasegawa *et al.*(2020)
5	17, 26	291	285, 1	286, 2	2, 80	kaempferol	Dall'Acqua *et al.*(2020)
7	19, 93	271	311	431	2, 37	Apigenin 6-C-glucoside	Gómez-Martínez et al.(2020)
8	20, 32	281	301	302	1, 93	quercetin	Chatti *et al.*(2009)
9	20, 72	256	300	302	7, 02	quercetin	Chatti *et al.*(2009)
10	21, 41	260	301	302	9, 94	quercetin	Chatti *et al.*(2009)
11	21, 59	259	300, 1	302	2, 32	quercetin	Chatti *et al.*(2009)
12	22, 16	257	447	447	11, 37	deprotonated quercetin aglycone	Dall'Acqua *et al.*(2020)
13	24, 88	264	284	Unknown	7, 58	Unknown	
14	27, 37	254	300	302	4, 86	quercetin	Chatti *et al.*(2009)
15	27, 97	274	287, 2	287	1, 36	luteolin	Dobroslavić *et al.*(2021)
16	28, 40	241	343, 2	Unknown	1, 90	Unknown	-
17	29, 36	268	286, 2	287	1, 83	luteolin	Dobroslavić *et al.*(2021)

Les résultats UHPLC/DAD/ESI-MS de l'extrait aqueux de *M. oleifera* ont révélé la prédominance de Flavonol glycosides tels que Quercetin-3-O-β-D-glucoside (Pic 3), Kaempferol-3-O-glucoside (Pic 4), et Kaempferol-acetyl-glycoside (Pic 12) (**Figure 49**). Le

composé le plus abondant parmi les polyphénoles de cet extrait et encore inconnu et nécessitait des recherches supplémentaires pour être identifier, le deuxième composé majoritaire est l'acide féruloylquinique (Acide phenolique) (Pic 5) (23.02%) suivi de Kaempferol-acetyl-glycoside (5,12%) et de Apigenin 6-C-glucoside (**Tableau 42**).

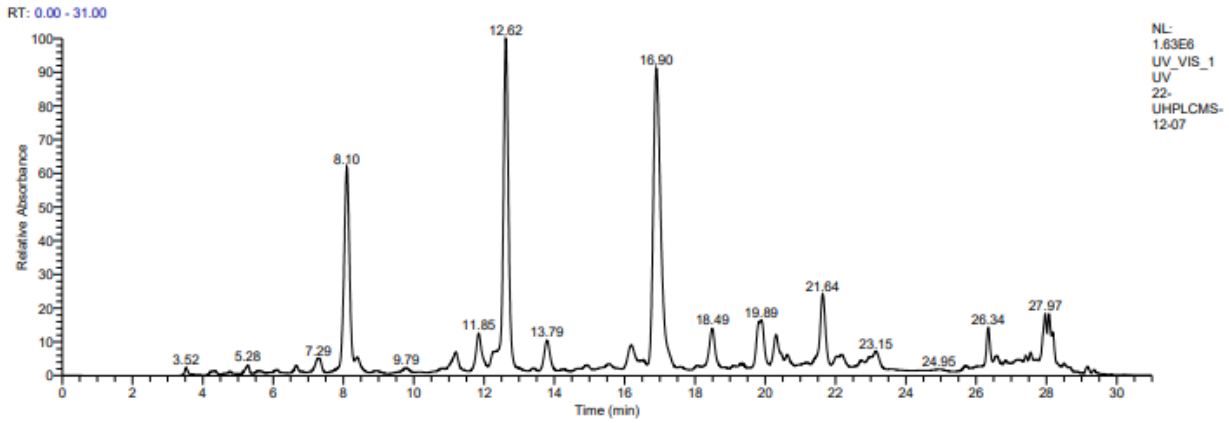


Figure 49. Chromatogramme HPLC de l'extrait de *M. oleifera*.

Tableau 42. Identification et quantification des composés phénoliques de *M. oleifera* par analyse HPLC-DAD-ESI-MS.

N	Tr (min)[a]	λmax (nm)	[M-H]$^{-1}$(m/z)	MW (m/z) [b]	Moringa (%)	Composés	Références
1	7, 29	240	353, 1	354.3	1, 20	5-Caffeoylquinic acid	Nouman *et al*.(2011)
2	8, 10	212	153	Unknown	14, 49	Unknown	-
3	11, 20	240	463, 2	464,09	1, 71	Quercetin-3-O-*β*-D-glucoside	Zhao *et al*.(2019)
4	11, 58	240	445, 2	446.9	2, 60	Kaempferol-3-O-glucoside	Zhao *et al*.(2019)
5	12, 62	324	367	367	23, 02	Feruloylquinic acid	Nouman *et al*.(2011)
6	13, 79	210	200, 9	Unknown	2, 36	Unknown	-
7	16, 19	250	301	302	2, 10	Quercetin	Coppin *et al*.(2013)
8	16, 90	222	295	Unknown	26, 74	Unknown	-
9	18, 49	215	311/ 431	431	3, 20	Apigenin 6-C-glucoside	Gómez-Martínez *et al*.(2020)
10	19, 89	240	431.1/311	431	4, 34	Apigenin 6-C-glucoside	-
11	20, 31	210	301	302	2, 35	Quercetin	Zhao *et al*. (2019)
12	21, 64	210	489, 1	489	5, 12	Kaempferol-acetyl-glycoside	Zhao *et al*.(2019)
13	23, 15	271	311	Unknown	1, 39	Unknown	-
14	26, 34	307	285	286.2	1, 76	Kaempferol	Nouman *et al*.(2019)
15	27, 97	316	251, 1	Unknown	2, 33	Unknown	-
16	28, 7	269	399, 3	Unknown	2,04	Unknown	-

4. Activité nématicide des extraits aqueux contre *T. semipenetrans*

a. Effets des extraits aqueux sur la mortalité des juvéniles J2

Les résultats de l'activité nématicide des extraits aqueux des PAM étudiées sont illustrées sur le **Tableau 43**.

Les extraits aqueux des PAM testées ont des effets très hautement significatifs sur la mortalité des juvéniles (J2) (P<0,0001). L'efficacité nématicide varie considérablement en fonction de la composition chimique (P<0,0001), de la concentration des extraits (P <0,0001) et de la durée d'incubation (P <0,001). Les extraits aqueux de toutes les espèces de PAM étudiées ont montré une forte activité nématicide contre *T. semipenetrans*, en termes de mortalité des J2. À une concentration d'extrait de 1 %, le taux de mortalité des juvéniles a été de 11,2 % et 4,42 % après 24 heures d'incubation, et a dépassé 31 % après 96 heures d'incubation (**Tableau 43**). À une concentration d'extrait de 10 %, la mortalité des J2 a atteint 77,55 %, 75,17 %, 72,45 %, 67,01 %, 57,82 %, 55,78 % et 55,44 % après 96 heures d'incubation pour les traitements par les HEs de *T. vulgaris*, *R. officinalis*, *C. nobile*, *M. oleifera*, *L. nobilis* et *F. vulgare* respectivement (**Tableau 43**).

R. officinalis et *T. vulgaris* ont été particulièrement actifs contre les J2 de *T. semipenetrans*, avec plus de 9,52 % et 11,2 % de mortalité des nématodes à une concentration d'extrait de 1 % après 24 heures d'incubation, plus de 67 % après 72 heures d'incubation à une concentration de 8 %, et plus de 75 % de mortalité après 96 heures d'exposition à une concentration d'extrait de 10 % (**Tableau 43**). Les extraits de *V. officinalis* et *M. oleifera* ont montré des taux de mortalité modérés, en particulier à plus faibles concentrations d'extrait et pour les courtes périodes d'incubation.

Tableau 43. Pourcentage de mortalité des juvéniles de deuxième stade (J2) de *Tylenchulus semipenetrans* après incubation dans les extraits aqueux de plantes aromatiques et médicinales, *Rosmarinus officinalis, Thymus vulgaris, Laurus nobilis, Verbena officinalis, Foeniculum vulgare, Moringa oleifera* et *Chamaemelum nobile* à 1, 4, 8 et 10 % pendant 24, 48, 72 et 96 heures.

	Concentration (%)	Période d'incubation (h)			
		24	48	72	96
Rosmarinus officinalis	**1**	9,52± 2,54^{jk}	12,25± 0,57^{j}	23,47 ± 0,58^{h}	30,95 ±1,20^{g}
	4	18,03± 0,33^{i}	24,15 ±1,02^{h}	47,28±3,67^{e}	54,59 ±1,58^{c}
	8	26,19 ± 0,96^{h}	27,89±0,33^{gh}	50 ±1,58^{de}	65,31 ±0,98^{b}
	10	42,19 ± 0,47^{f}	32,31±5,73^{g}	53,47±0,33^{cd}	75,17 ±2,40^{a}
Laurus nobilis	**1**	4,42 ±1,27^{k}	8,50±4,33^{jk}	16,67±0,33^{ijk}	22,29± 0,33^{h}

	4	13,95±0,33^{j}	14,63 ± 0,64^{j}	30,27 ±0,33^{g}	41,84±1,53^{f}
	8	19,39±0,53^{i}	21,77± 0,15^{h}	39,12± 0,33^{f}	48,30 ±0,88^{e}
	10	25,15±0,62^{h}	26,87±0,67^{h}	48,30 ±0,33^{d}	57,82± 3, 32^{c}
Verbena officinalis	**1**	5,44 0,27^{k}	10,88 ± 0,33^{j}	21,77 ± 1,20^{h}	25,85±1,20^{h}
	4	9,52 ± 1,88^{j}	18,37± 0,57^{i}	28,57±0,58^{gh}	40,14 ± 0,88^{f}
	8	17,69 ± 0,33^{ij}	24,49±0,57^{h}	30,27 ±0,88^{g}	48,98± 0,58^{e}
	10	26,09±0,47^{gh}	25,85±1,20^{h}	40,48 ±1,20^{f}	55,44 ±1,88^{c}
Foeniculum vulgare	**1**	6,46 ±0,27^{k}	9,18 ±0,57^{jk}	14,63± 0,33^{jk}	21,43± 0,58^{h}
	4	9,86 ±0,33^{jk}	14,36± 0,33^{j}	27,21 ±0,33^{h}	31,29 ±0,33^{g}
	8	14,97± 3,33^{j}	17,35 ±0,57^{ij}	43,20± 0,33^{ef}	49,66±1,20^{e}
	10	24,15 ±0,72^{h}	20,07± 0,88^{fi}	49,32 ±0,67^{e}	55,78±1,20^{c}
Moringa oleifera	**1**	4,42± 0,27^{k}	10,54± 0,33^{j}	21,77 ±0,33^{h}	29,25 ±0,67^{gh}
	4	10,54±0,33^{j}	18,37±0,57^{i}	41,84±1,53^{f}	50,34 ±1,86^{cd}
	8	13,61 ±0,33^{j}	21,77 ±0,42^{h}	50,34 ±0,88^{cd}	64,29± 3,58^{b}
	10	24,64 ±0,47^{h}	24,15± 3,38^{h}	54,76 ±1,17^{c}	67,01± 1,20^{b}
Chamaemelum nobile	**1**	7,48 ±1,27^{k}	16,67 ±0,88^{ijk}	24,15 ±0,33^{h}	28,91± 0,33^{gh}
	4	16,33 ±1,61^{ij}	23,81±2,21^{h}	47,28±1,67^{e}	52,72 ±1,20^{c}
	8	20,07±0,88^{hi}	26,19±1,08^{h}	58,16±2,51^{c}	68,03± 2,88^{b}
	10	25,07 ±0,33^{h}	26,87±0,67^{h}	62,24 ±1,15^{bc}	72,45± 5,58^{ab}
Thymus vulgaris	**1**	11,22± 0,47^{j}	15,31±2,47^{j}	26,56 ±0,58^{h}	31,29 ±0,57^{g}
	4	20,75±0,65^{hi}	24,49±1,43^{h}	47,28 ± 0,88^{ef}	57,82± 5,33^{c}
	8	28,57±0,28^{gh}	31,29±0,54^{g}	53,06± 0,58^{cd}	67,35 ±1,58^{b}
	10	49,28±0,47^{e}	33,33 ±1,32^{g}	57,82 ±0,33^{c}	77,55± 0,57^{a}
ED		1±0,00^{l}	1,2±0,03^{l}	11±0,00^{k}	13,6±0,71^{j}

Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

b. Dose létale à 50 % (DL50) et à 90 % (DL90) des extraits aqueux

Les doses létales DL50 et DL90, qui représentent les quantités nécessaires pour provoquer la mort de 50 % et 90 % de la population de *T. semipenetrans*, sont présentées dans le **Tableau 44**. Lors du premier jour d'exposition aux extraits aqueux, la valeur de la DL50 a varié de 5,22 % pour l'extrait de *T. vulgaris* à 11,52 % pour l'extrait de *F. vulgare.* De même, les valeurs de la DL90 ont fluctué entre 11,71 % et 22,41 % pour les extraits de *T. vulgaris* et *F. vulgare* respectivement. Les valeurs les plus basses enregistrées pour DL50 et DL90 après 96 h ont été respectivement de 0,61% et 2,93% pour *M. oleifera* et de 1,08 % et 3,41 % pour *C. nobile* (**Tableau 44**). Après 96 heures d'incubation, il n'a pas été possible de calculer les valeurs de DL50 et DL90 pour *T. vulgaris* et *R. officinalis* en raison d'un taux de mortalité élevé (100%) des juvéniles de *T. semipenetrans*.

Tableau 44. Doses létales de *T. semipenetrans* à 50% (DL50) et à 90% (DL90) des extraits aqueux des espèces de PAM étudiées.

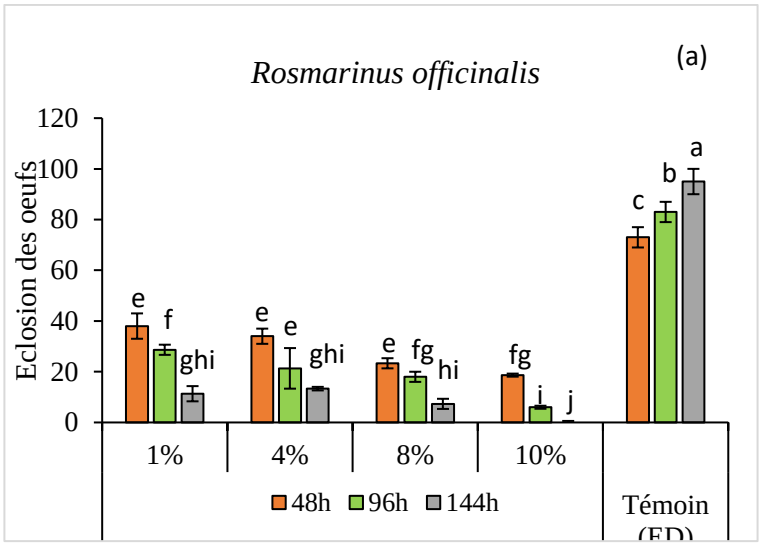
	DL50 (%)*				DL90 (%)**			
	24h	**48h**	**72h**	**96h**	**24h**	**48h**	**72h**	**96h**
R. officinalis	6.11 (5,51-6,72)	6,14 (5,17-7,15)	1,06 (2,88-2,24)	-	13,11 (11,89-14,79)	17,93 (15,18-22,67)	3,75 (2,52-10,15)	-
L. nobilis	10,04 (8,97-11,63)	9,22 (8,14-10,82)	2,98 (2,28-3,58)	1,16 (0,45-1,72)	20,04 (17,15-24,86)	20,60 (17,36-26,23)	9,15 (8,34-10,22)	5,52 (4,88-6,41)
V. officinalis	10,08 (9,08-11,50)	8,80 (7,53-10,78)	2,78 (0,97-3,97)	0,88 (0,07-1,49)	19,16 (16,63-23,22)	23,14 (18,71-31,98)	16,27 (13,52-21,40)	5,44 (4,77-6,38)
F. vulgare	11,29 (9,91-13,55)	13,60 (10,85-20,53)	3,32 (2,81-3,79)	2,07 (1,41-2,61)	22,41 (18,76-28,91)	32,92 (24,27-56,49)	8,16 (7,11-8,97)	7,04 (6,15-8,38)
M. oleifera	11,02 (9,82-12,89)	10,05 (8,41-13,13)	1,41 (0,87-1,84)	0,61 (0,05-0,98)	20,80 (17,76-25,92)	26,58 (20,71-39,81)	4,88 (4,29-5,73)	2,93 (2,46-3,74)
C. nobile	9,88 (8,62-11,90)	7,26 (5,40-10,29)	1,08 (0,66-1,40)	1,08 (0,66-1,40)	22,31 (18,45-29,42)	30,74 (21,94-59,34)	3,41 (2,99-4,02)	3,41 (2,99-4,02)
T. vulgaris	5,22 (3,89-6,55)	5,19 (4,08-6,20)	0,85 (0,34-1,22)	-	11,71 (9,63-16)	17,71 (14,87-22,74)	3,37 (2,93-4,02)	-

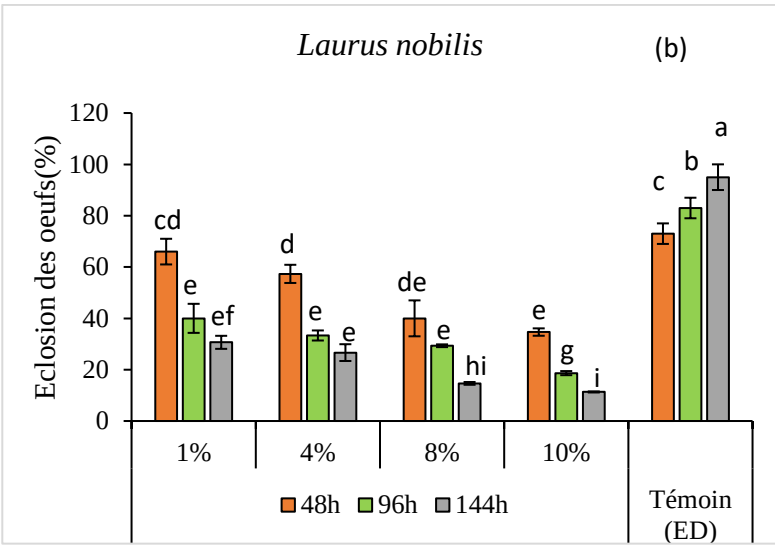
*la dose qui provoque la mort de 50% de la population testée
** la dose qui provoque la mort de 90% de la population testée

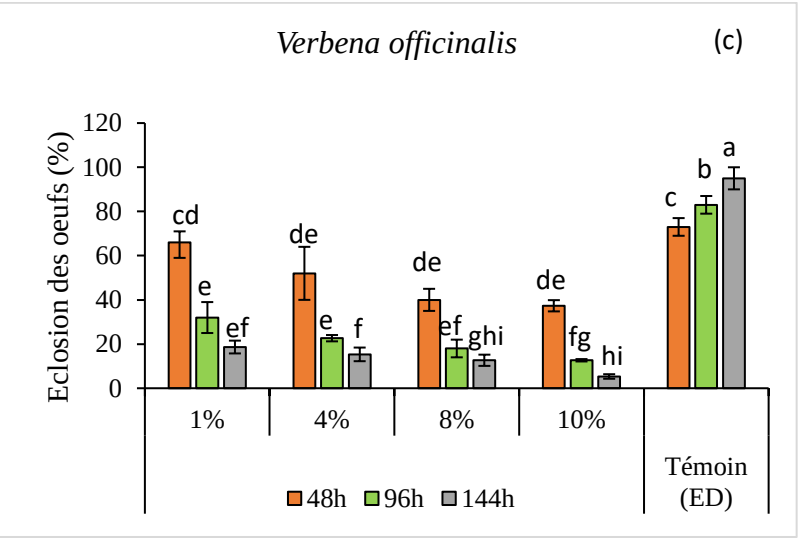
c. Effet des extraits aqueux sur l'éclosion des œufs de *T. semipenetrans*

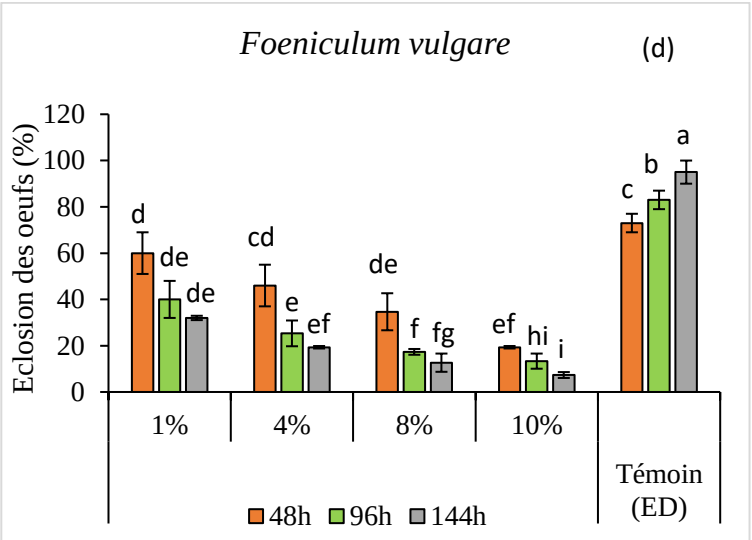
Les résultats de l'efficacité ovicide des différents extraits de plantes testés sont illustrés sur la **Figure 50**. Les extraits de PAM évalués ont inhibé de manière significative l'éclosion des œufs de *T. semipenetrans* (P<0,0001). En augmentant la concentration des extraits et la durée d'incubation, une diminution proportionnelle de l'éclosion des œufs a été observée atteignant un taux d'inhibition allant jusqu'à 100% après 144 heures de traitement avec les extraits de *R. officinalis* et *T. vulgaris* à une concentration de 10% (**Figure 50**).

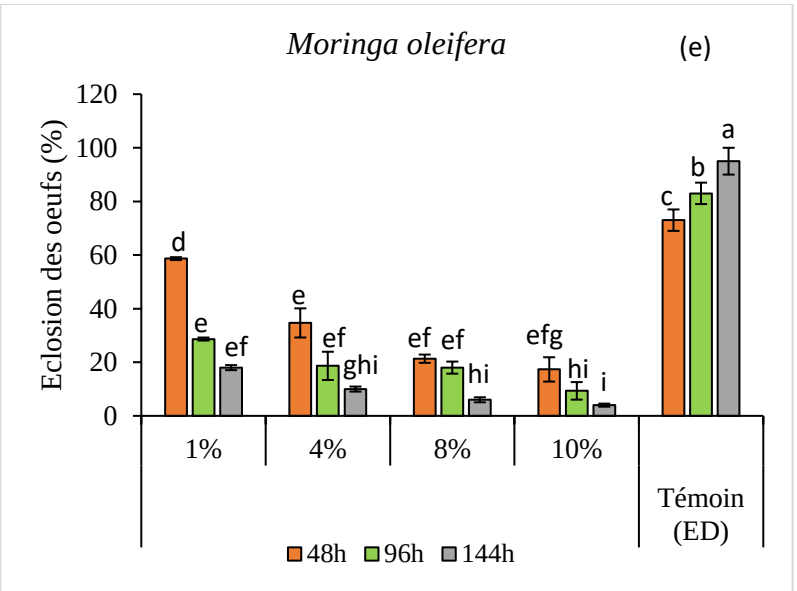
Les extraits de *C. nobile* et *M. oleifera* ont également montré une forte efficacité ovicide, avec des taux d'éclosion d'œufs ne dépassant pas 2% pour *C. nobile* et *M. oleifera*, soit 31,6 fois moins que le taux d'éclosion observé chez le témoin après 144h d'incubation à la concentration 10 %.

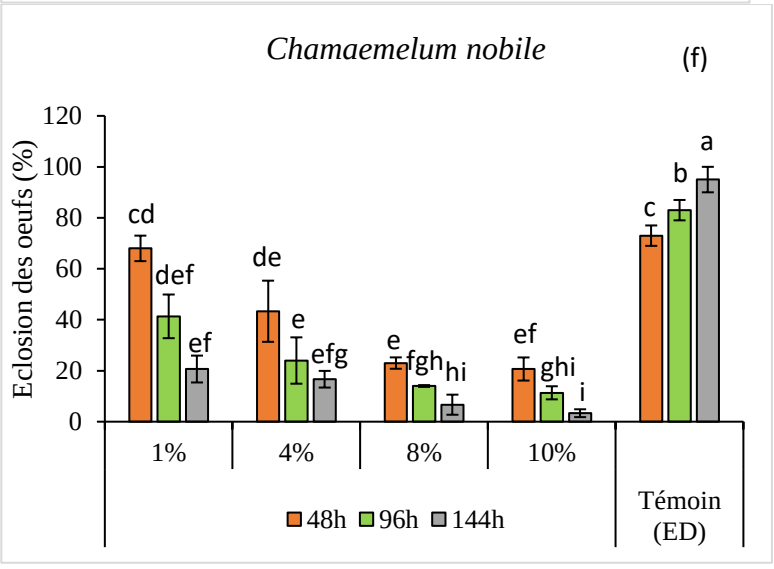

Rosmarinus officinalis
(a)
Eclosion des oeufs
120
100
80
60
40
20
0
e f ghi
e e ghi
e fg hi
fg i j
c b a
1%
4%
8%
10%
48h 96h 144h
Témoin (ED)


Laurus nobilis
(b)
Eclosion des oeufs(%)
120
100
80
60
40
20
0
cd e ef
d e e
de e hi
e g i
c b a
1%
4%
8%
10%
48h 96h 144h
Témoin (ED)


Verbena officinalis
(c)
Eclosion des oeufs (%)
120
100
80
60
40
20
0
cd e ef
de e f
de ef ghi
de fg hi
c b a
1%
4%
8%
10%
48h 96h 144h
Témoin (ED)


Foeniculum vulgare
(d)
Eclosion des oeufs (%)
120
100
80
60
40
20
0
d de de
cd e ef
de f fg
ef hi i
c b a
1%
4%
8%
10%
48h 96h 144h
Témoin (ED)


Moringa oleifera
(e)
Eclosion des oeufs (%)
120
100
80
60
40
20
0
d e ef
e ef ghi
ef ef hi
efg hi i
c b a
1%
4%
8%
10%
48h 96h 144h
Témoin (ED)


Chamaemelum nobile
(f)
Eclosion des oeufs (%)
120
100
80
60
40
20
0
cd def ef
de e efg
e fgh hi
ef ghi i
c b a
1%
4%
8%
10%
48h 96h 144h
Témoin (ED)

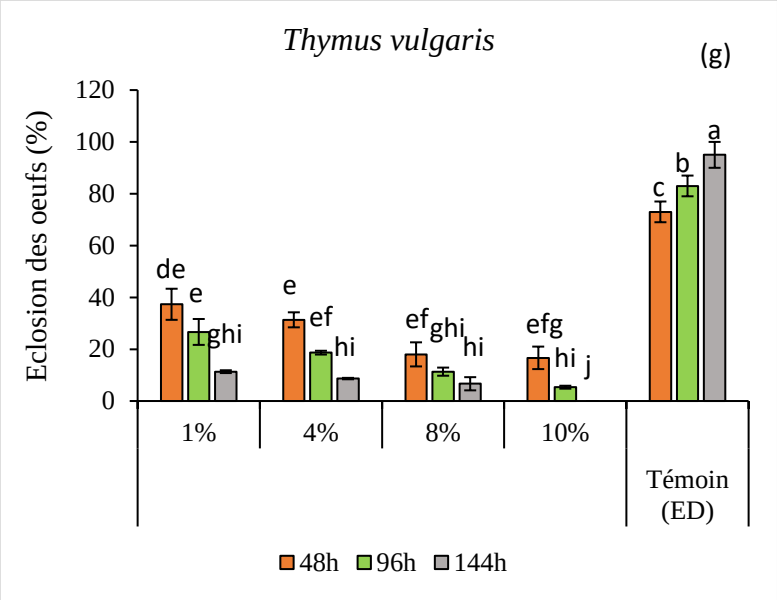


Figure 50. Éclosion des œufs de *Tylenchulus semipenetrans* après 48, 96 et 144 heures d'exposition aux extraits aqueux de plantes aromatiques et médicinales, *Rosmarinus officinalis* (a), *Laurus nobilis* (b), *Verbena officinalis* (c), *Foeniculum vulgare* (d), *Moringa oleifera* (e), *Chamaemelum nobile* (f) et *Thymus vulgaris* (g) à des concentrations de 1, 4, 8 et 10 %. Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Tukey à $p < 0,05$.

d. Activité nématicide des extraits aqueux in vivo

i. Effet des extraits sur les paramètres phytonématologiques

L'effet nématicide des EA de différentes plantes aromatiques et médicinales *Rosmarinus officinalis, Thymus vulgaris, Laurus nobilis, Verbena officinalis, Foeniculum vulgare, Moringa oleifera* et *Chamaemelum nobile*) a été évalué *in vivo* sur des plantules de *Citrus Volkameriana* préalablement infestées par *T. semipenetrans*. Les plantules ont été traitées avec des extraits aqueux à une concentration de 10% (concentration ayant donné les meilleurs résultats *in vitro*). À la fin de l'expérience, des analyses phytonématologiques ont été réalisées et les résultats sont présentés dans le **Tableau 45**. Les résultats montrent que la population finale de *T. semipenetrans* a significativement varié tant au niveau du sol ($p<0,0001$) qu'au niveau des racines ($p<0,0001$) suite au traitement avec les extraits de PAM. Les données du **Tableau 45** indiquent que les extraits aqueux ont été significativement efficaces pour ralentir, stabiliser (dans le cas du romarin) et réduire (dans le cas du thym) la reproduction de *T. semipenetrans* sur les plantules de *Volkameriana*. Le traitement avec le thym a montré le facteur de reproduction le plus faible au niveau du sol (0,91) et des racines (0,21), suivi du romarin avec un taux de 0,95 au niveau du sol et 0,24 au niveau des racines. L'extrait de *Moringa oleifera* a présenté le facteur de reproduction le plus élevé dans le sol (1,67), tandis

que les extraits de *Foeniculum vulgare* et *Verbena officinalis* ont montré le facteur de reproduction le plus élevé au niveau des racines (0,35).

Tableau 45. Population initiale et population finale de *T. semipenetrans* dans le sol rhizosphérique et dans les racines, ainsi que le facteur de reproduction dans le sol rhizosphérique et dans les racines chez le porte-greffe d'agrume *Citrus volkameriana*, inoculés avec *T. semipenetrans* et cultivés sous serre.

Traitements	Population initiale/pot	Population finale (sol) /pot	Facteur de reproduction (sol)	Population finale (racines)/pot	Facteur de reproduction (racines)
Témoin	500±0,47^{e}	997,30±5,31^{a}	1,99	185,00±5,13^{a}	0,37
C. nobile		673,41±16,08^{f}	1,35	146,66±26,76^{bcd}	0,29
M. oleifera		836,27±3,76^{b}	1,67	135,67±4,16^{cde}	0,27
R. officinalis		475,00±1,76^{g}	0,95	122,00±7de	0,24
L. nobilis		706,67±7,03^{d}	1,41	158,41±8,62^{bc}	0,32
F. vulgare		753,33±5,65^{c}	1,51	177,51±8,50^{ab}	0,35
V. officinalis		733,43±4,10^{e}	1,47	175,62±5,54^{b}	0,35
T. vulgaris		453,29±1,88^{h}	0,91	105,00±6,50^{e}	0,21

Les chiffres dans la même colonne suivis de lettres différentes sont significativement différents selon le test de Tukey ($p<0,05$).

ii. Effet des extraits sur les paramètres agronomiques de *Citrus volkameriana*

Les résultats de l'effet des extraits de PAM sur les paramètres de croissance de *Citrus volkameriana* suite à une infestation par *T. semipenetrans* sont présentés dans le **Tableau 46**. Les résultats indiquent que la réponse des plantules de *Citrus volkameriana* aux traitements avec les EA de PAM, mesurée en termes de variation des paramètres de croissance et de production de biomasse, a significativement varié entre les différents extraits appliqués. En effet, la masse fraîche (MFPA) ($p<0,005$), la masse sèche (MSPA) ($p<0,003$) des pousses et la longueur racinaire (LR) ($p<0,0001$) ont montré des variations significatives entre les différents traitements. Tandis que, la longueur des pousses (LA), la masse fraîche (MFR) et sèche des racines (MSR), ainsi que le diamètre du tronc (DT) n'ont pas montré de variations significatives ($P>0,05$). Tous les traitements ont entraîné une augmentation de la longueur des racines (LR) et de la masse fraîche (MFPA) et sèche (MSPA des pousses (**Tableau 47**). En effet, Le traitement avec l'extrait de *R. officinalis* a enregistré la plus forte augmentation de la LR par rapport au témoin (59,86%) (inoculé par *T. semipenetrans* sans traitement), suivie de *F. vulgare*

(56,19%) et de *V. officinalis* (53,38%), tandis que l'augmentation la plus faible de LR a été observée avec le traitement par l'extrait de *C. nobile* (10,61%) (**Tableau 47**).

La masse fraîche (MFPA) et la masse sèche (MSPA) des tiges ont également augmenté significativement par rapport au témoin (P <0,05). La plus forte augmentation de MFPA et MSPA a été observée avec le traitement par l'extrait aqueux de *M. oleifera*, avec une amélioration respective de 95,22% et 81,69%, suivi de *R. officinalis* avec une amélioration de 74,07% de MFPA et 47,53% de MSPA, et de *V. officinalis* avec une amélioration respective de 70,88% et 37,24% (**Tableau 47**).

L'extrait aqueux de *L. nobilis* a eu le plus faible effet sur l'augmentation de MFPA et MSPA des tiges, avec des valeurs respectives de 41,22% et 18,89% par rapport au témoin. De même, l'extrait de *C. nobile* a montré le moins d'effet sur l'augmentation de la longueur racinaire (LR), avec seulement 10,61% d'augmentation par rapport au témoin (**Tableau 47**).

Tableau 46. Effet de traitement par les extraits aqueux (EA) des PAM sur la masse fraîche (MFR) et sèche (MSR) et la longueur (LR) des racines, sur la masse fraîche (MFPA) et sèche (MSPA), la longueur (LPA) des parties aériennes et sur la longueur (LA) et le diamètre du tronc (DT) chez le porte-greffe d'agrume *Citrus volkameriana*, inoculés avec *T. semipenetrans* et cultivés sous serre.

	Racines			l'allongement aérienne			
Traitements	**MFR (g)**	**MSR (g)**	**LR (cm)**	**MFPA (g)**	**MSPA (g)**	**LA (cm)**	**DT (cm)**
Témoin	18,66±0,70^{ab}	7,11±3,39^{ab}	15,43±0,1^{d}	56,03±1,15^{c}	16,2±3,74^{c}	64±8,49^{a}	3,76±0,19^{a}
C. nobile	22,22 ±1,25^{ab}	10,63±1,59^{ab}	17,06±0,47^{bcd}	90,24±1,67^{ab}	19,53±2,23^{bc}	74,53±0,27^{a}	4,33±0,27^{a}
M. oleifera	19,39±0,93^{ab}	13,22±3,32^{ab}	19,16±0,47^{abcd}	109,38±0,82^{a}	29,43±1,55^{a}	78±3,74^{a}	3,77±0,32^{a}
R. officinalis	28,14±0,74^{a}	13,24±0,25^{ab}	24,66±0,98^{a}	97,53±1,62^{ab}	23,9±1,09^{abc}	67,33±2,68^{a}	3,33±0,13^{a}
L. nobilis	19,81±0,95^{ab}	9,25±0,42^{ab}	21,33±0,72^{acd}	79,12±1,06^{abc}	19,26±0,25^{bc}	72,33±0,17^{a}	3,83±0,36^{a}
F. vulgare	26,55±0,85^{a}	11,55±0,54^{ab}	24,1±0,54^{ab}	92,67±1,83^{ab}	19,53±0,33^{bc}	65,33±4,37^{a}	3,83±0,13^{a}
V. officinalis	21,04±2,19^{ab}	11,25±0,98^{ab}	23,66±0,43^{abc}	95,74±1,24^{ab}	22,23±0,58^{abc}	72±1,47^{a}	3,5±0,23^{a}
T. vulgaris	24,06±0,92^{ab}	11,09±2,11^{ab}	22,23±1,27^{abc}	85,89±4,72^{ab}	21,6±0,77^{bc}	70,6±0,95^{a}	4,1±1,25^{a}

Les chiffres dans la même colonne suivis de lettres différentes sont significativement différents selon le test de Tukey (p<0,05).

Tableau 47. Augmentation (%) de la longueur racinaire (LR), de la masse fraîche (MFRA) et sèche (MSPA) des pousses de *Citrus volkameriana.*

	Augmentation (%)		
	LR	MFPA	MSPA
C. nobile	10,61	61,06	20,58
M. oleifera	24,22	95,22	81,69
R. officinalis	59,86	74,07	47,53
L. nobilis	38,26	41,22	18,89
F. vulgare	56,19	65,39	20,56
V. officinalis	53,38	70,88	37,24
T. vulgaris	44,09	53,30	33,33

IV. DISCUSSION

Il actuellement admis que les HEs de certaines plantes aromatiques et médicinales (PAM) sont dotés d'une multitude d'activités biologiques, notamment leur pouvoir nématicides contre plusieurs nématodes phytoparasites (PPN) et offrent ainsi un potentiel considérable pour une gestion durable de ces NPP (Meyer *et al*., 2008 ; Gupta *et al*., 2011; Barua *et al*., 2020). En effet, l'efficacité des huiles essentielles, dérivées de plantes appartenant aux familles *Lamiaceae, Apiaceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae* et *Lauraceae,* contre les NPP tels que *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp., *Ditylenchus dipsaci* et *Bursaphelenchus xylophilus*, ainsi que contre les nématodes à kystes *Heterodera* spp. et *Globodera* spp., a été largement documentée (Andrés *et al*., 2012; Laquale *et al*. 2018; D'addabbo *et al*. 2021). Cependant, les investigations qui se sont intéressées à l'étude du potentiel de ces HEs dans le contrôle du nématode des agrumes *T. semipenetrans* sont relativement limitées. Dans cette étude nous avons montré que les huiles essentielles de R. *officinalis, L. nobilis, V. officinalis, F. vulgare, M. oleifera, C. nobile* et *T. vulgaris* sont doté d'une activité nématicide puissante contre *T. semipenetrans*. Les HEs de ces PAM ont, en effet, provoqué une mortalité de 100% des juvéniles (J2) et une inhibition totale de l'éclosion des œufs de ces NPP. Le pouvoir nématicide de ces PAM a varié considérablement en fonction de la concentration des HEs, du temps d'incubation et de l'espèce de PAM. A faible concentration (5 µl/ml), l'activité nématicide des HEs a été assez faible chez toutes les PAM étudiées, soit des taux de mortalité des juvéniles (J2) variant entre 5% et 23% et des taux de réduction de l'éclosion des œufs entre 0 et 69% après 24 et 48 heures d'incubation respectivement. En revanche, les HEs des PAM étudiées sont dotés d'un très fort pouvoir nématicide à concentration de 20 µl/ml se traduisant par une mortalité totale des J2 et une

inhibition complète de l'éclosion des œufs après 96 et 144 heures d'incubation respectivement. L'effet nématicide des HEs des PAM a été rapporté par plusieurs travaux antérieurs confirmant ainsi la toxicité des huiles essentielles de ces PAM vis-à-vis des NPP (Sangwan *et al*., 1990; Kostyukovsky *et al*., 2002; Ntalli *et al*., 2011; Barua *et al*., 2020). L'efficacité des HEs a significativement varié en fonction des espèces de PAM. Les HEs de thym (TV) et de romarin (RO) se sont révélées particulièrement toxiques pour les juvéniles de deuxième stade (J2) du nématode des agrumes *T. semipenetrans*. En effet, pour ces deux espèces de PAM, une mortalité de 100% a été observée à une concentration en HEs de 10 µl/ml après 96 heures d'incubation. Avato *et al*. (2017) ont confirmé l'effet suppressif élevé des huiles essentielles de *R. officinalis* contre *Meloidogyne incognita*, *Xiphinema index* et *Pratylenchus vulnus* avec des taux de mortalité respectifs de 75%, 98% et 100% à une concentration de 15 µg/ml pendant 96 heures d'incubation. De même, Chavan *et al*. (2019) ont rapporté un taux de mortalité supérieur à 80% des juvéniles de *Meloidogyne javanica* après 96 heures d'exposition aux huiles essentielles de *R. officinalis*. Les huiles essentielles de *R. officinalis* et *T. vulgaris* utilisées dans cette étude sont composées d'un mélange complexe de monoterpènes, monoterpènes oxygénés, monoterpenols et sesquiterpènes. Cette composition des HEs est similaire à celle décrite précédemment par Fadil *et al*., (2018) et par Feriotto *et al*., (2018). La toxicité de ces HEs pour les NPP pourrait être due à l'effet synergique de ces constituants. D'Addabbo *et al*. (2020) ont souligné que les huiles essentielles des plantes ont des activités biologiques multiples en fonction de leur composition chimique. Dans la présente étude, l'efficacité nématicide élevée des huiles essentielles de *R. officinalis* et *T. vulgaris* peut être attribuée à la présence d'Eucalyptol (44%), β-Myrcène (13,86%), Linalool (9,30%) et Camphre (16,90%) comme principaux composants des HEs de *R. officinalis*, et au carvacrol (72%), β-caryophyllène (4,85%), β-cymène (5,80%), γ-terpinène (6,50%) et thymol (3,05%) comme constituants majeurs des HEs de *T. vulgaris*. En effet, D'Addabbo *et al*. (2020) et Brikci *et al*. (2021) ont rapporté que les composés naturels tels que β-phellandrène, fenchone, thymol et α-pinène extraits de plantes de la famille des *Lamiaceae*, inhibent la sécrétion de la carboxylase cible d'Acétyl CoA, une enzyme responsable de la synthèse des acides gras chez *T. semipenetrans*. Ces composés, présents dans les huiles essentielles de *R. officinalis* et *T. vulgaris*, pourraient jouer un rôle crucial dans leur activité hautement efficace contre *T. semipenetrans* observée dans la présente étude. L'efficacité du carvacrol (Rivera *et al*., 2017), du thymol (Chowdhary *et al*. 2018) et du β-phellandrène (Brikci *et al*. 2021) contre les J2 a été largement démontrée. Les valeurs de DL50 et DL90 ont varié respectivement de 5,98 à 13,52 µl/ml pour les huiles

essentielles de *R. officinalis* et de 4,718 à 13,471 µl/ml pour les huiles essentielles de *T. vulgaris* après 24 h d'incubation. Laquale *et al*. (2018) ont rapporté des valeurs DL50 de 29,5 µg/ml et 14,2 µg/ml pour le carvacrol contre *Pratylenchus vulnus* et *Meloidogyne incognita* respectivement, et une DL50 de 82,9 µg/ml pour l'o-Cymène contre *P. vulnus* après 24 h de traitement. Le carvacrol et son isomère thymol se sont révélés très toxique contre les NPP des genres *Meloidogyne*, *Xiphinema* et *Pratylenchus* (Tsao and Yu, 2000; Barua *et al*., 2020; D'Addabbo *et al*., 2020; Klein *et al*., 2020;), ce qui explique la forte activité des HEs de *T. vulgaris* (72,77% de carvacrol et 3,05% de thymol) en termes de mortalité des Juvéniles (J2) et d'inhibition d'éclosion des œufs de *T. semipenetrans* observées dans la présente étude. Cette toxicité pourrait être due à une altération du mécanisme régulant l'éclosion des œufs en fonction de leur maturation physiologique comme le suggèrent Deng *et al*. (2022).

A faible concentration, les huiles essentielles de *Laurus nobilis*, *Chamaemelum nobile*, *Verbena officinalis* et *Moringa oleifera* ont montré une faible toxicité contre *T. semipenetrans*. Cependant, à concentration élevée, ces HE se sont révélées très efficaces induisant une forte mortalité des juvéniles (J2) et une forte inhibition de l'éclosion des œufs.

L'huile essentielle de *F. vulgare* a montré une forte activité nématicide *in vitro* contre *T. semipenetrans* en termes de mortalité des J2 et 'inhibition de l'éclosion des œufs. La composition de cette huile essentielle (trans-anéthole (63,10%), D-Limonène (17,99%), benzaldéhyde (4,32%), estragole (2,08%) et acétate de fenchyle (2,08%)), est similaire à celle décrite précédemment par Belabdelli *et al*. (2020) et Ghasemian *et al*. (2020). L'activité nématicide de *F. vulgare* peut être attribuée à la présence de limonène, ce métabolite étant également un constituant de *Citrus sinensis* et ayant prouvé son efficacité contre *M. incognita*, *P. vulnus* et *X. index* (Laquale *et al*., 2018; Goyal *et al*., 2021). De plus, l'huile essentielle de *F. vulgare* contient de l'estragole et du trans-anéthole qui ont également été démontrés comme toxiques pour différents ravageurs, y compris les NPP (Ibrahim *et al*. 2006; Sousa *et al*. 2015; Ntalli *et al*. 2020) .

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* (LN) a induit une mortalité de plus de 70% des juvéniles (J2) à une concentration de 5 µl/ml après 96 h d'incubation. L'éclosion des œufs a diminué significativement avec l'augmentation de la concentration d'huile et du temps d'incubation, avec moins de trois œufs éclos à une concentration de 15 µl/ml pendant 96 h. Ce résultat confirme les travaux de Oka *et al*. (2000) qui ont rapporté l'immobilisation de plus de 80% des J2 de *M. incognita* après 2 jours d'incubation et une inhibition complète de l'éclosion

des œufs après 96h d'incubation (Kaur *et al*., 2018). Le potentiel nématicide de *L. nobilis* contre *T. semipenetrans* pourrait être lié à la présence d'eucalyptol, linalool et α-terpinéol oxygénés comme principaux composés. En effet, nos résultats montrent que ces composés sont toxiques pour le nématode des agrumes *T. semipenetrans*, provoquant une inhibition complète de l'éclosion des œufs et une mortalité totale des J2 à une concentration d'huile essentielle de 20 µl/ml après respectivement 144 et 96 heures d'incubation, avec des valeurs de DL50 qui varient entre 4,23 et 7,96 µl/ml après 24h. En accord avec nos résultats, des études antérieures ont également indiqué une forte activité de *C. nobile* contre les NPP tels que le nématode du bois de pin *B. xylophilus* et le nématode à galles *M. incognita* (El-Deen *et al*. 2007; Seo *et al*. 2014).

L'effet nématicide de l'huile essentielle de *M. oleifera* contre les juvéniles et les œufs de *T. semipenetrans* pourrait être attribué à ses principaux constituants d'acides gras incluant l'acide palmitique (37,39%), l'acide linoléique (9,89%) et l'acide stéarique (6,06%). Özcan (2020) a rapporté que les HEs de *M. oleifera* a été modérément toxiques pour *T. semipenetrans* (J2 et œufs) à faible concentration (5-10 µl/ml), mais fortement actives contre les J2 après 96 h et contre les œufs après 6 jours d'incubation.

L'huile essentielle de *V. officinalis* est constituée d'un mélange complexe de terpènes oxygénés eucalyptol (12,69%), 1-Adamantaneméthanol (3,48%), Camphre (1,14%), α-Terpineol (1,99%) et sesquiterpènes α-curcumène (38%) et Cuparène (6,28%). Ces composés ont démontré une forte activité nématicide, comme l'ont montré les études de Silva *et al*. (2013) et Barros *et al*. (2014). Cependant, dans la présente étude, cette huile essentielle a montré une activité nématicide inférieure à celle des huiles essentielles de *R. officinalis*, et *T. vulgaris*. Ces deux dernières se distinguent par la présence caractéristique de β-caryophyllène et de β-cymène, mettant ainsi en lumière l'importance fondamentale de ces composés spécifiques dans leur efficacité en tant qu'agents nématicides.

Les composés aromatiques contenant des éléments hautement électronégatifs semblent être très actifs contre les NPP en agissant sur leur système nerveux en tant qu'inhibiteur de l'acétylcholinestérase qui bloque les récepteurs de l'octopamine (Kostyukovsky *et al*., 2002; Martin and Robertson, 2010). D'autres composés des HEs peuvent agir sur d'autres tissus et organiques des NPP, y compris le stylet, l'intestin et le pharynx (Geng *et al*. 2016). Oka (2001) a suggéré que les HEs perturbent la membrane cellulaire du nématode et modifient sa perméabilité. Selon Caboni *et al*. (2012), les aldéhydes insaturés (E, E)-2,4-décadiénal et (E)-2-décénal réagissent avec les groupes amino ou thiol de la cuticule du nématode, provoquant

des dommages mécaniques importants et une fuite du fluide interne des nématodes (Caboni *et al*., 2012). De plus, les huiles essentielles peuvent induire un stress oxydatif, entraînant des modifications irréversibles de l'ADN, des protéines et des lipides (Ayaz *et al*., 2021), conduisant ainsi à une mortalité rapide des nématodes (Kalaiselvi *et al*., 2019).

Plusieurs composés à effet nématicides ont été isolés des extraits de plantes aromatiques et médicinales, principalement celles appartenant à la famille des *Asteraceae*, *Lamiaceae* et *Apiaceae* (Mwamula *et al*., 2022). La richesse de ces plantes en flavonoïdes (flavones, flavanones et flavonols) et leurs dérivés aglycones et glycosidiques, les acides phénoliques, l'iridoïdes et d'autres métabolites secondaires, expliquerait probablement leur effet sur la mortalité du nématode des agrumes *T. semipenetrans*. Nos résultats suggèrent que les extraits des sept plantes aromatiques et medicinales testées peuvent potentiellement servir pour le contrôle de nématode des agrumes *T. semipenetrans*. En effet, le traitement par les extraits des différentes plantes a provoqué un pourcentage de mortalité élevé (> 55%) *in vitro*, et à une stabilisation voire une diminution des populations des nématodes (Fr< 1,67) *in vivo.* Ces extraits se sont également révélés être des stimulateurs importants de la croissance des plantes. En effet, leur application a entrainé une amélioration significative de la croissance et de la production de biomasses chez les plantules de *Citrus volkameriana*. Le pouvoir nématicide des extraits des PAM étudiées a été significativement influencé par la concentration des extraits, la durée de la période d'incubation et par l'espèces de PAM. Les taux de mortalité les plus élevés (> 55%) ont été obtenus avec une incubation dans une concentration de 10% pendant 96h chez toutes les PAM étudiées. Les extraits de *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis* se sont avérés les plus actifs contre le nématode des agrumes. En effet, une solution à 10% des extraits de ces plantes a provoqué des taux de mortalité des juvéniles respectifs de 77,6% et 75,2% après 96 heures d'incubation et une inhibition totale de l'éclosion des œufs (0 œuf éclos) après 144 heures d'incubation. Les autres espèces de PAM ont également montré un effet nématicide important, *Chamaemelum nobile* (72.5% de mortalité), *Moringa oleifera* (67%), *Laurus nobilis* (57.8%), *Foeniculum vulgare* (55.8%) et *Verbena officinalis* (55.4%), mais significativement inférieur à celui des deux espèces précédentes. Ce pouvoir nématicide élevé des extraits de ces espèces de PAM a été également rapporté chez d'autres nématodes (Montasser *et al*., 2012) et serait principalement attribué à leur richesse en flavonoïdes, flavanols, acides phénoliques et d'autres composés bioactifs (Elzawahry *et al*., 2014). En effet, la quercétine, le flavone apigénine et kaempferol ont augmenté significativement la mortalité des juvéniles *de M.*

incognita (Bano *et al*., 2020). De plus, les flavonoïdes ont également été associés à l'inhibition du développement larvaire (Morais-Costa *et al*., 2015), de l'exuviation larvaire (Mengistu *et al*., 2017), et de la migration larvaire ainsi qu'à une réduction de la motilité des adultes de *H. contortus* (Féboli *et al*., 2016). Nos résultats suggèrent que la présence de plus d'une classe de ces composés serait nécessaire pour une activité nématicide élevée. Cette suggestion est renforcée d'une part par le fait que l'extrait de *Laurus nobilis*, qui, malgré sa richesse en flavonoïde, s'est avéré moins actif sur ce NPP probablement en raison de l'absence d'autres classes de composés ; et d'autre part le fait que le profil chimique des espèces ayant le pouvoir nématicide le plus élevé (*R. officinalis* et *C. nobile*) contient plus d'une classe de métabolites) démontrant une action synergique évidente. Les résultats de l'essai *in vivo*, ont montré que tous les extraits de PAM ont réduit de manière significative l'infestation des racines, probablement due à leur effet sur l'immobilisation et à la mortalité de *T. semipenetrans*. Les composés chimiques de ces extraits tels que le complexe d'acide chlorogénique ou les glucosides phénoliques (Clark 1959), pourraient occuper les espaces poreux du sol ou être absorbés par les racines des plantes. Cela pourrait avoir pour effet de tuer ou d'immobiliser les nématodes, et de déclencher chez les agrumes une réaction de défense contre ces derniers (Iqbal, Mukhtar, and Ahmad, 2005). Giebel (1974) a également suggéré que les substances chimiques présentes chez les plantes aromatiques et médicinales pourraient influencer la composition en acides aminés et en phénols, et provoquer des lignifications pour limiter le développement des nématodes.

V. CONCLUSION

Le potentiel nématicide des huiles essentielles (HEs) et des extraits aqueux de sept plantes aromatiques et médicinales (PAM), *Rosmarinus officinalis, Chamaemelum nobile, Laurus nobilis, Verbena officinalis, Foeniculum vulgare, Moringa oleifera* et *Thymus vulgaris* a été examiné vis-à-vis du nématode des agrumes *T. semipenetrans*. Les HEs se sont révélées riches en eucalyptol (44 %), 4-propan-2-ylsulfonylbenzaldéhyde (20,47 %), α-Curcumène (38 %), trans-anéthole (63,10 %), acide palmitique (37,39 %) et carvacrol (72 %). Cependant, les extraits se sont avérés riches en acide carnosique (20.66 %), acide p-coumaroxyquinic B (50.92 %), epicatechin (12.61 %), Aucubin (15.85 %), Quercetin (65.85 %) et Feruloylquinic acid (23.02 %). Ces composés majeurs ont contribué à une forte activité nématicide en termes de mortalité des J2 et d'inhibition de l'éclosion des œufs du nématode des agrumes *T. semipenetrans*.

Les huiles essentielles ont démontré une efficacité supérieure contre les juvéniles et les œufs de *T. semipenetrans* par rapport aux extraits aqueux. L'activité nématicide des huiles essentielles a augmenté de manière significative avec l'augmentation de la concentration et de la durée d'incubation, atteignant 100 % de mortalité des J2 après 96 h d'incubation et 100 % d'inhibition d'éclosion des œufs après 144 h d'incubation à une concentration de 20 µl/ml.

Pour les extraits aqueux, la mortalité des juvéniles a varié entre 77.5 % et 55.4 % pour les extrait de *Thymus vulgaris* et de *Verbena officinalis* respectivement après 96 h d'incubation à une concentration de 10 %. De même, les extraits de toutes les PAM testées ont réussi à inhiber complètement l'éclosion des œufs lorsqu'ils ont été appliqués à une concentration de 10 % pendant 144 heures. Les résultats de l'expérience *in vivo* ont montré que les extraits des PAM étudiées sont dotés non seulement d'un pouvoir nématicide élevé, mais également d'une capacité importante à stimuler la croissance des plantes d'agrumes. En effet, en plus d'une réduction significative des populations de *T. semipenetrans,* par rapport au témoin (facteur de reproduction FR<1 chez le thym et le romarin), l'application de ces extraits a induit une importante amélioration des paramètres agronomiques des plantules de *Citrus volkameriana*.

L'efficacité nématicide contre *T. semipenetrans* a été plus importante chez*, R. officinalis* et *T. vulgaris* avec des valeurs DL50 et DL90 les plus basses (<6 µl/ml pour HEs et <7 % pour les extraits).

Les résultats de ce chapitre montrent que les PAM testées, notamment *R. officinalis* et *T. vulgaris,* ont un grand potentiel pour contrôler le nématode des agrumes *T. semipenetrans*. Elles pourraient servir de base pour le développement et la formulation de nématicides biologiques efficace et constituent une alternative aux nématicides chimiques aux effets nocifs pour l'environnement et la santé des consommateurs.

CHAPITRE VII

SYNTHESE GENERALE

I. RAPPEL DE LA PROBLEMATIQUE ET DES OBJECTIFS

La filière des agrumes, premier groupe de fruits exportés au Maroc, est considérée comme un secteur stratégique participant à l'équilibre de la balance commercial et jouant un rôle socio-économique de premier ordre. Cependant, depuis quelques années le secteur agrumicole marocain est soumis à plusieurs contraintes biotiques et abiotiques limitant sérieusement sa productivité. Parmi ces contraintes, les plus menaçants sont les nématodes phytoparasites (NPP) qui peuvent causer des pertes de rendement de 10 à 30% soit l'équivalent de 11,97 millions de dollars par an. Les pertes réelles de rendement pourraient même être plus élevées à cause du manque de données dans de nombreux pays dont le Maroc où l'expertise en nématologie fait défaut. La gestion des NPP s'appuie largement sur l'utilisation des nématicides chimiques, dangereux pour l'homme et l'environnement. Leur action éphémère et leur impact sur les coûts de production rendent nécessaire la recherche d'alternatives durables. L'objectif principal de cette thèse est de développer des méthodes de lutte biologique contre les NPP en particulier *T. semipenetrans*. Cet objectif se décline en deux sous-objectifs. Le 1er consiste à étudier la répartition géographique des NPP dans les cinq principales régions agrumicoles nationales, ainsi que leur dynamique en fonction des saisons et des conditions agronomiques. Le 2 ^{ème} sous-objectif porte sur la recherche d'outils biologiques pour lutter contre le nématode *T. semipenetrans*. Il s'agit de : 1) sélectionner les porte-greffes résistants à ce nématode, 2) explorer le potentiel nématicide du microbiome rhizosphériques (bactéries, champignons, CMA) des agrumes, et 3) évaluer la toxicité de certaines plantes aromatiques et médicinales contre *T. semipenetrans*.

Sur la base des résultats obtenus et présentés dans les cinq chapitres de cette thèse, cette synthèse générale vise à apporter des éléments de réponse aux principales questions de recherche posées au départ :

II. PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS DURANT CETTE THESE

1. Distribution et diversité des NPP

Pour mieux comprendre la distribution des NPP associés à la rhizosphére des agrumes au Maroc, des enquêtes approfondies ont été menées dans les principales régions productrices d'agrumes du pays. Sur la base des caractéristiques morphologiques et morphobiométriques, onze genres et dix espèces de NPP ont été identifiés. *T. semipenetrans* était l'espèce la plus commune et la plus abondante dans tous les vergers d'agrumes étudiés, En effet, *T. semipenetrans* a été le nématode le plus prédominant dans les régions de Souss-Massa (Taroudant) (100%), Gharb (M'nasra) (100%), Marackech-Safi (Souihla) (83,3%), Berkane (Aglmine) (81,8%) et Beni et Mellal-Khenifra (Guettaya) (66,7%). Cette espèce est

remarquable non seulement pour son association étroite avec les agrumes, mais aussi pour la capacité des agrumes à supporter des populations très élevées sans entraîner immédiatement de symptômes. La large distribution de *T. semipenetrans* pourrait être attribuée à de nombreux facteurs dont, l'irrigation et la mécanisation facilitant le déplacement du sol ainsi que des résidus végétaux infestés d'un endroit à un autre (Abd-Elgawad *et al*., 2016). En outre, la grande variabilité des genres de NPP observée dans cette étude peut être attribuée à la variation des facteurs écologiques et édaphiques entre et au sein des différentes régions étudiées (Abu Habib *et al*., 2020). *Helicotylenchus* s'est révélé être le deuxième genre le plus répandu après *T. semipenetrans*, avec une variabilité allant jusqu'à 80% à Souihla dans la région de Marrakech-Safi. Ce genre a été largement observé au Maroc, infectant diverses cultures, notamment dans les tunnels de culture de framboise (*Rubus idaeus*) (Mokrini, *et al*., 2019), les vignobles (*Vitis vinifera*) (Mokrini, 2019), les champs de safran (*Crocus sativus*) (Mokrini, *et al*., 2019), et les vergers d'agrumes (Mokrini *et al*., 2018b). La prévalence de ce genre a été plus élevée dans les vergers d'agrumes marocaines par rapport à l'Espagne (Sorribas *et al*., 2008) et l'Egypte (Abu Habib *et al*., 2020). Le genre *Xiphinema*, considéré comme l'un des dix NPP les plus importants économiquement (Jones et al., 2013), a également été observé dans les vergers d'agrumes nationaux. Ce nématode ectoparasite migrateur est particulièrement problématique car il peut abriter et transmettre des virus végétaux (Jones *et al*., 2013) tels que le virus de la mosaïque de l'Arabis (ArMV) (Jha and Posnette, 1961) et le virus des taches en anneaux du tabac (Tobacco ring spot virus, TRSV) (McGuire, 1973). Ainsi, même à faible densité, ces espèces de nématodes peuvent causer des dommages significatifs aux plantes (Hewitt *et al*., 1958; Fisher and Raski, 1967). Les différentes espèces de *Xiphinema* identifiées dans cette étude présentent une répartition variable selon les régions productrices d'agrumes étudiées. *X. pachtaichum* a été observée à Beni Mellal-Khenifra (6,7 %) et à Berkane (6,3%), tandis que *X. diversicaudatum* a été rencontré dans les régions de Marackech-Safi (13,3%), Beni Mellal-Khenifra (16,7%), et Berkane (13,6%). Enfin, *X. americanum*, vecteur de Virus du court-noué de la vigne (GFLV), Virus de la mosaïque de l'arabette (ArMV) (Jha and Posnette, 1961), et Virus associé à l'enroulement foliaire de la vigne-3 (GLRaV-3), a été détectée dans les régions de Marrakech-Safi (20 %), Beni Mellal-Khenifra (10%) et Berkane (3,1%). Cette espèce de nématode qui n'avait jamais été signalée auparavant comme parasite des agrumes, pourrait avoir été introduite en raison de la proximité géographique des plantations d'agrumes avec les vignobles (Martin *et al*., 2005).

Une fois introduits, ces nématodes pourraient s'adapter à de nouveaux hôtes et devenir une menace pour les cultures d'agrumes. Par conséquent, il est essentiel de mettre l'accent sur la nécessité d'une surveillance régulière pour détecter les parasites émergents et prévenir leur propagation dans les systèmes agricoles. D'autres genres de nématodes, tels que *Tylenchorhynchus*, *Paratylenchus*, *Trichodorus*, *Longidorus*, *Meloidogyne* et *Rotylenchus*, ont également été repérés dans toutes les régions étudiées. Cependant, leurs prévalences, leurs intensités d'infestation et leurs densités totales se sont révélées nettement inférieures par rapport aux genres précédemment mentionnés.

2. Interaction entre la distribution des communautés des nématodes phytoparasites et les facteurs physico-chimiques du sol

La compréhension de l'interaction entre les propriétés physicochimiques du sol et la distribution des NPP est essentielle pour une gestion efficace durable de ces phytoparaistes. Ainsi, une corrélation positive a été mise en évidence entre la prévalence de *T. semipenetrans* et les teneurs en éléments minéraux du sol, notamment le potassium (K), le calcium (Ca) et le sodium (Na). De même, une corrélation positive a été observée entre la prévalence des genres *Trichodorus*, *Longidorus* et *Tylenchus* et la teneur en humidité du sol. Cependant, la plupart des NPP ont montré une corrélation négative avec le carbone et la matière organique du sol (**Figure 16. Chapitre II**) probablement en raison de l'accumulation des nitrates par nitrification, un phénomène considéré comme nuisible pour les NPP (Rodriguez-Kabana, 1986). Par ailleurs, la teneur en phosphore a été positivement corrélée à la présence de *Meloidogyne* spp, *Xiphinema* spp et *Pratylenchus* spp. (Nisa et al. 2021), tandis que la teneur en azote a été positivement associée à *Criconemoides* sp. Le pH du sol a été identifié comme un facteur déterminant de l'abondance des nématodes des agrumes. Des études antérieures, comme celles de Wang et al. (2009) et Spann et Schumann (2010), ont indiqué que les sols à faible pH (5,2–6,8) favorisent une augmentation de l'abondance et de la diversité des nématodes. Cependant, d'autres recherches, comme Salahi Ardakani et al. (2014) ont observé une plus grande abondance de *T. semipenetrans* dans les sols à pH alcalin.

La texture et la structure du sol ont un impact important sur la distribution et la mobilité des nématodes du sol. D'après nos résultats, les sols sablo-limoneux ont une influence positive sur la répartition de la plupart de nématodes phytoparasites des agrumes. Dans une étude récente, Laasli *et al*. (2022) ont constaté que certains nématodes, tels que *Aphelenchoides* spp, *Merlinius* spp et *Pratylenchus* spp, étaient associés aux sols sableux et limoneux dans les champs de blé, tandis que d'autres, tels que *Longidorus* spp. et

Xiphinema spp., étaient plus fréquents dans les sols riches en argile (**Figure 16. Chapitre II**).

L'analyse des indices de diversité des NPP (**Tableau 8. Chapitre II**) dans les différentes régions étudiées a révélé que les régions de Marrakech-Safi, Beni Mellal et Gharb présentent une diversité de nématodes plus élevée que celle de Souss-Massa et de Berkane. Ces résultats indiquent que la diversité des nématodes est influencée par le facteur site. Cependant, il est important de noter que d'autres facteurs tels que la saison, les pratiques agricoles et la présence de cultures associées aux agrumes pourraient également avoir une incidence sur la diversité des nématodes phytoparasites.

3. Evaluation de la variation saisonnière des principaux NPP associes aux agrumes dans la region de marrakech –safi

Pour mieux comprendre la dynamique saisonnière des populations des NPP associés aux agrumes, des prospections saisonnières ont été menées dans les différents sites prospectés au niveau de la région de Marrakech, domaine agricole Graoua, domaine agricole Benkebboura et Arsat Moulay Abdessalam (**Figure 21. Chapitre III**). Les résultats obtenus ont montré que globalement la saison printanière a été la plus favorable au développement des NPP, suivie de l'automne, tandis que la saison d'été a été la moins propice au développement de ces nématodes. Néanmoins, la dynamique des populations des NPP en fonction des saisons a significativement varié avec les espèces des NPP. Tenant compte de sa densité dans le sol rhizosphérique et dans les racines, le nématode des agrumes *T. semipenetrans* a été le plus prévalent quelque soit la saison et le site étudiés. En effet, ce nématode représente à lui seul plus de 66% des NPP totaux dans le sol du domaine Graoua, plus de 51% au domaine Benkebboura et plus de 50 % à Arsat Moulay Abdessalam quelle que soit la saison. En plus, *T. semipenetrans* a enregistré les prévalences maximales, soit 100% au printemps, 83% en automne, et 60% en été. Ces résultats suggèrent que les populations des NPP sont fortement influencées par la succession des saisons, enregistrant les effectifs les plus élevés au printemps et en automne. En effet, selon plusieurs études (Sorribas *et al*., 2000; Saeed *et al*., 2019; Abokorah and Elsebaay, 2022) la densité des populations des NPP des agrumes suit une évolution bimodale avec deux pics, l'un au printemps et l'autre en automne, probablement en réponse au développement de nouvelles racines fibreuses sur lesquelles les nématodes se développent et se nourrissent. Cependant, selon Duncan and Eissenstat (1993), la disponibilité de nouvelles racines fibreuses n'est pas suffisante à elle seule pour expliquer la variation de la densité des NPP. En effet, ces auteurs ont constaté un déclin de la population de nématodes en été, alors que la biomasse racinaire des agrumes a

augmenté de 75 % pendant cette période. Duncan and Eissenstat, (1993) ont rapporté que la teneur des racines en hydrates de carbone est l'un des facteurs principaux déterminant la dynamique des NPP, comme démontré par la faible densité de ces nématodes en été coïncidant avec un contenu en carbohydrates des racines relativement faible en cette saison (**Figure 51**). D'autre part, la température et l'humidité du sol sont également des facteurs clés affectant la dynamique saisonnière des populations de nématodes phytoparasites (Verschoor, 2002 ; Nisa *et al*., 2021). Ces facteurs peuvent influencer directement la survie, la reproduction et l'activité des nématodes.

Parmi les trois sites étudiés, le domaine Graoua est celui qui présente la plus forte infestation de nématodes (663 individus/100g de sol au printemps, 579 individus/100g de sol en automne et 414 individus/100g de sol en été), suivi du domaine Benkebboura (170 individus/100g de sol au printemps, 100 individus/100g de sol en été et 116 individus/100g de sol en automne), tandis que Arsat Moulay Abdeslam est le site le moins infesté (80 individus/100g de sol au printemps, 56 individus/100g de sol en été et 80 individus/100g de sol en automne). Cette différence du degré d'infestation entre les trois sites peut être attribuée aux pratiques agricoles adoptées dans chaque site. En effet, le domaine Graoua est équipé de système moderne permettant le pilotage de l'irrigation et la fertilisation assurant de meilleures conditions en eau et fertilisants pour les cultures en place. Le domaine Benkebboura utilise également le système de goutte à goutte qui sert en même temps pour fertiliser les cultures mais le pilotage reste manuel et moins perfectionné qu'au domaine Graoua. Par ailleurs, à Arsat moulay Abdessalam l'irrigation reste conventionnelle, il n'y a pas de programme de fertilisation sinon par addition de fumure organique. Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux de Liu *et al*. (2016), qui ont également observé une augmentation de la densité des nématodes dans les cultures de riz et de blé fertilisées par rapport aux témoins non fertilisés, avec une variation allant de 15% à 90%. Cette augmentation peut être expliquée par l'effet bénéfique des engrais sur la croissance des cultures, ce qui entraîne une augmentation de la quantité de rhizodépôts ou de résidus qui servent de substrats pour les micro-organismes et les nématodes (Traoré *et al*. 2012). Cependant, l'ajout de la matière organique au sol peut avoir des effets bénéfiques en réduisant la densité et la survie des nématodes (Verdejo-Lucas and McKenry, 2004), ce qui pourrait expliquer le faible taux d'infestation dans le jardin Arsat Moulay Abdeslam, où le taux de matière organique est le plus élevé (1.99%). En effet, la décomposition de la matière organique peut libérer des produits toxiques pour les nématodes ou stimuler la croissance des champignons qui sont leurs ennemis naturels (Moosavi, 2022; Jabbar and Abedulridah, 2023).

L'utilisation de cultures associées peut également être une pratique efficace pour réduire les populations des NPP. Cette stratégie a été mise en œuvre avec succès dans le domaine Benkebboura, où l'utilisation de l'oignon comme culture de couverture a permis de réduire considérablement la densité des NPP. En effet, les racines d'oignon libèrent des exsudats favorisant la prolifération de micro-organismes utiles tels que les champignons mycorhiziens et les bactéries PGPR, qui peuvent contribuer à la réduction des populations de nématodes (Zhou *et al*., 2011; Vives-Peris *et al*., 2020) (**Figure 51**). En outre, la libération d'exsudats racinaires spécifiques, tels que le 4-hydroxy-benzèneéthanol inhibe l'activité des juvéniles et diminue la capacité d'éclosion des œufs des nématodes à galles des racines. Le 4-hydroxy-benzèneéthanol a été confirmé comme un nématicide naturel efficace (Ali and Saifullah, 2019).

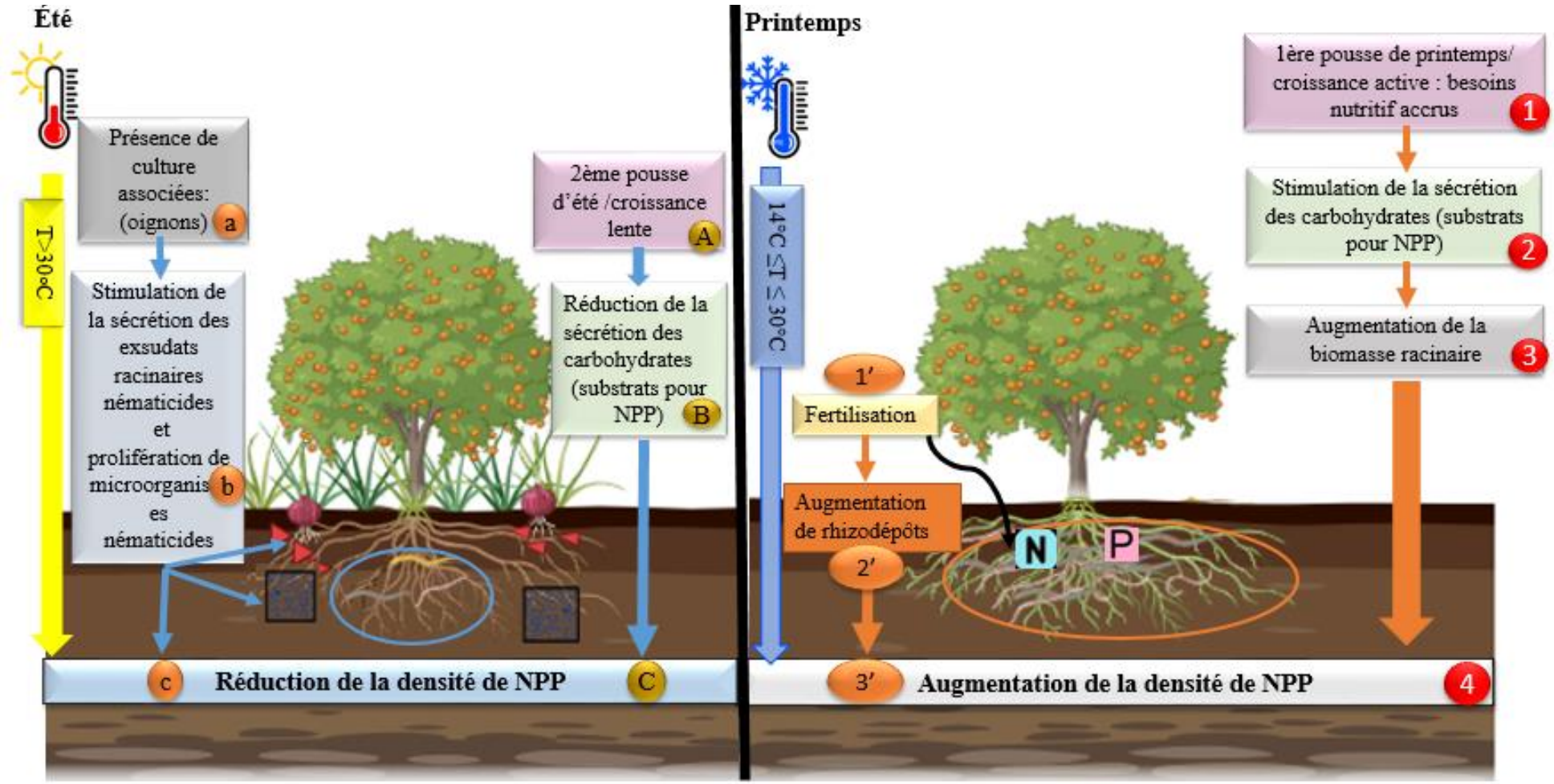


Figure 51. Schéma conceptuel des mécanismes impliqués dans l'influence des saisons, des pratiques agricoles (fertilisation, présence ou absence de cultures associées) sur la densité de NPP des agrumes.

En tenant compte des divers facteurs que nous avons précédemment discutés, l'effet porte-greffes pourrait également s'avérer être un des facteurs explicatifs de la différence des degrés d'infestations et de l'abondance des NPP observés entre les différents sites.

4. Évaluation de la résistance de certains porte-greffes d'agrumes au nématode *T. semipenetrans*

Cette partie du travail vise à sélectionner des porte-greffes d'agrumes ayant un potentiel élevé de résistance à *T. semipenetrans* en termes de capacité à prévenir la reproduction du nématode à la fois dans le sol et dans les racines, et à limiter l'infestation des racines par ce ravageur. Elle a également pour objectif de contribuer à une compréhension approfondie des changements morphologiques et biochimiques qui se produisent chez ces plantes d'agrumes en réponse à l'inoculation par ce phytoparasite. Les résultats obtenus montrent que l'inoculation avec *T. semipenetrans* a négativement affecté la croissance et la production de biomasse chez toutes les variétés porte-greffes étudiées comparé aux témoins. De plus, chez tous les porte-greffes, l'inoculation avec *T. semipenetrans* a induit un stress oxydatif mis en évidence par l'augmentation de l'accumulation du malondialdéhyde (MDA) et par l'activation du métabolisme antioxydatif impliquant l'augmentation des activités des enzymes antioxydants, telles que la catalase (CAT), la peroxydase (PO) et la polyphénol oxydase (PPO (**Tableau 48**). Nos résultats montrent que la réaction à l'inoculation avec *T. semipenetrans,* a significativement varié entre les variétés porte-greffes utilisées. En effet, le Citrange Carrizo inoculé a présenté la croissance et la production de biomasse les plus élevées et le nombre le plus faible de femelles (0,33) de *T. semipenetrans* par cm de racines, démontrant sa grande capacité à limiter la multiplication de ce NPP à la fois dans son sol rhizosphériques (541,56/100g de sol) et dans ses racines (135,01 / 10g de racines). En revanche, le Bigaradier, le Bigaradier Australien et le *Citrus Volkameriana* ont été les plus sensibles à l'infestation (FRs > 88,39). Ils en résultent des populations finales (Pfs) de 1062/100g de sol pour le Bigaradier, 1030/100g de sol pour le Bigaradier Australien et 1053/100g de sol pour le *Citrus volkameriana*. Ces variétés porte-greffes ont également présenté une diminution importante de leurs performances agronomiques (croissance et production de biomasse) et leur altération de leur fonctionnalité suite à l'infestation par *T. semipenetrans*. En effet, l'augmentation de la population des NPP et de leurs sites d'alimentation engendrent une succion forte et continue des nutriments compromettant la capacité du système racinaire à absorber et à transloquer l'eau et les nutriments vers les différents organes de la plante affectant ainsi négativement sa croissance et son développement (Afzal *et al*., 2021). L'infestation des agrumes par *T. semipenetrans* est ainsi, généralement,

associée à une forte réduction de la croissance et de la production de biomasses racinaires et aériennes (Deka *et al*., 2003; Ayazpour *et al*., 2010; Montasser *et al*., 2012).

Nos expériences ont révélé que les porte-greffes tels que le Bigaradier, le Bigaradier Australien et *Citrus volkameriana*, considérés sensibles à l'infestation par *T. semipenetrans* (tenant compte des résultats des paramètres nématologiques et de la classification de Mani *et al*. (1989)), ont tendance à développer des activités enzymatiques antioxydantes (PO, PPO et CAT) significativement plus élevées que les porte-greffes résistants tel que Citrange Carrizo. Ces observations suggèrent que les plantes sensibles à l'infestation par *T. semipenetrans* sont plus exposées au stress oxydatif et présentent une activité métabolique accrue en réponse à l'attaque par ce nématode parasite des plantes. Cela implique que chez les porte-greffes sensibles, l'infestation par *T. semipenetrans* entraîne une production accrue de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont nocifs pour les cellules végétales (**Figure 52**). Ces molécules sont extrêmement réactives et perturbent gravement le métabolisme et les structures cellulaires (Bartels and Sunkar, 2005; França *et al*., 2007). En outre, le MDA a été fortement accumulé chez les porte-greffes d'agrumes sensibles tels que le bigaradier, le bigaradier australien et Volkameriana par rapport aux porte-greffes résistants tels que Citrange Carrizo, suggérant que ce dernier a moins souffert du stress oxydatif dû à *T. semipenetrans*, due probablement à sa capacité à éliminer les ROS via l'activation des enzymes antioxydants comme telle la CAT et la PO (Mirzaei *et al*., 2013). Ainsi, la défense des plantes contre *T. semipenetrans* peut impliquer des mécanismes pré ou post-infectieux (**Figure 52**). Les mécanismes pré-infectieux ont pour but d'empêcher *T. semipenetrans* de pénétrer dans les racines, soit en raison de la barrière mécanique de certains épidermes racinaires, soit en raison de la synthèse d'exsudats racinaires non attractifs, répulsifs ou même toxiques aux nématodes (Kaplan, 1981). Dans les mécanismes post-infectieux, la plante réagit à la pénétration profonde des nématodes en produisant des substances toxiques, telles que les phytoalexines, ou en déclenchant une réponse d'hypersensibilité qui se traduit par la production de divers composés cellulaires et l'activation du système de défense dans les minutes qui suivent l'infestation (Kaplan, 1981). Enfin, les tissus para-corticaux peuvent dévier leur métabolisme pour rétablir l'intégrité anatomique des tissus lésés ou pour arrêter la progression du parasite par intoxication ou en lui offrant un environnement inadéquat. La résistance peut aussi être génétiquement médiée. Des études ont suggéré que la résistance à *T. semipenetrans* pourrait être due à un ou plusieurs gènes principaux, qui codent pour des protéines impliquées dans la défense contre les nématodes (Verdejo-Lucas *et al*. 2003; Javed *et al*. 2008).

Tableau 48. Paramètres nématologiques (nombre de femelles de *T. semipenetrans* par cm de racines), physiologiques (activités CAT, PO, et PPO et accumulation de MDA) et type de réaction des porte-greffes d'agrumes les plus utilisés au Maroc, Bigaradier, Bigaradier Australien, Citrange Troyer, Citrange Carrizo, Citrange C-35, Volkameriana et Macrophylla, inoculés avec *T. semipenetrans* et cultivés sous serre.

	Paramètres nématologiques	Paramètres physiologiques				Réaction de Porte-greffe
	Nombre de femelles/Cm de racines	Catalase	PO	PPO	MDA	
Bigaradier	3,33	+++	+++	+++	+++	Sensible
Big australian	3	+++	+++	+++	+++	Sensible
Citrange Troyer	1	++	++	++	++	Tolérant
Citrange Carrizo	0,33	+	+	+	+	Résistant
Citrange 35	1	++	++	++	++	Tolérant
Volkameriana	3	+++	+++	+++	+++	Sensible
Macrophylla	2	++	++	++	++	Tolérant

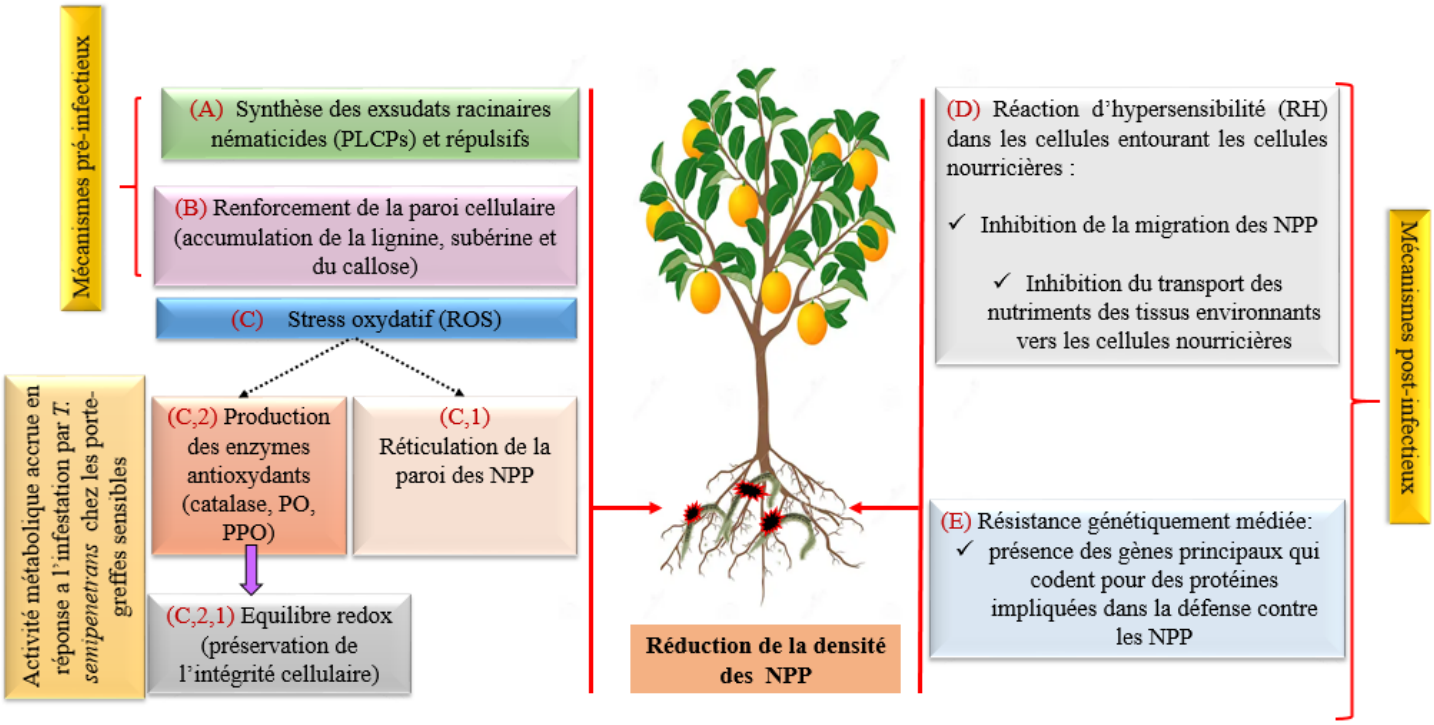


Figure 52. Schéma conceptuel des mécanismes impliqués dans la résistance des porte-greffes d'agrumes contre le nématode *T. semipenetrans*.

"PLCPs": Papain-Like Cysteine Proteases

5. Évaluation du potentiel nématicide du microbiome rhizosphériques des agrumes

Nous avons montré dans les chapitres précédents que les caractéristiques pédologiques, le type de porte-greffes et les pratiques culturales (cultures associées, etc.) affectent considérablement la dynamique des populations des NPP et leur capacité d'infester les racines et les sols rhizosphériques des agrumes. Cette action serait due, entre autre, à leur effet sur le microbiome rhizosphérique (Hunt and Handoo, 2009), L'utilisation de certains microorganismes et leurs métabolites, constitue des outils efficaces dans la lutte intégrée contre les NPP des agrumes, en particulier *T. semipenetrans*. Parmi ces micro-organismes rhizosphériques, on trouve les bactéries, les champignons et les champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA). Ainsi, l'objectif de cette section de travail est d'évaluer l'efficacité nématicide du microbiome des sols rhizosphériques des agrumes contre *T. semipenetrans*. Cela implique de : 1) faire l'inventaire, isoler et identifier les microorganismes (bactéries, mycètes et champignons mycorhiziens arbusculaires) associés à la rhizosphère des agrumes, et 2) évaluer leur performance en tant qu'agents de biocontrôle contre *T. semipenetrans* à travers des tests de confrontation *in vitro* et *in vivo*.

Le criblage sélectif des microorganismes rhizosphériques à activité nématicides a révélé que cinq souches bactériennes (*paradoxus* (OQ651063), *B. pseudomycoides* (OQ652044), *B. simplex* (OQ651985), *B. cereus* (OQ651999), et *P. speluncae* (OQ652010)) et trois souches fongiques (*P. lilacinus, A. ustus* (OR250163) et *A. terreus* (OR250916)) ont montré une activité nématicide importante contre *T. semipenetrans* à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cependant, cette activité nématicide a significativement varié avec les espèces bactériennes et fongiques, leurs concentrations et le temps d'incubation. En effet, le traitement combinant les différentes bactéries ($3{,}6 \times 10^5$ cellules/ml) a provoqué la mort de toutes les juvéniles J2 (taux de mortalité de100%) après 96 h d'incubation. Une performance quasi-similaire (un taux de mortalité de 98,98%) a été enregistrée par *B. cereus.* En outre, toutes les bactéries testées ont provoqué une inhibition totale de l'éclosion des œufs, quelle que soit la concentration et la durée d'incubation. Le potentiel nématicide de ces bactéries pourrait être dû à la production des métabolites secondaires à effet nématicides tels que, des toxines et/ou des composés organiques volatils comme le disulfure de diméthyle, l'isovalérate de méthyle et la 2-undécanone (Viljoen *et al*., 2019; Yin *et al*. 2021 ; El-Ashry *et al*., 2023) et d'enzymes hydrolytiques, en particulier des protéases, des collagénases et des chitinases, qui jouent un rôle important dans la dégradation des différents composants chimiques des nématodes à différents stades de leur développement (Castaneda-Alvarez and Aballay, 2016) (**Figure 53**).

En ce qui concerne les champignons, la meilleure activité nématicide contre J2 (taux de mortalité > 93%) a été obtenue avec *P. lilacinum* et *A. terreus* après 168 h d'incubation à une concentration de 10^8 spores/ml. De même, tous les champignons ont provoqué une inhibition totale de l'éclosion des œufs à des concentrations supérieures à 10^6 spores/ml. En outre, les observations microscopiques ont révélé que les différents champignons testés exercent des actions différentes sur *T. semipenetrans*. Dans le cas de *P. lilacinum*, l'action se manifeste par une invasion directe de la surface des œufs par les hyphes du champignon, qui produisent des appressoria à la surface, infectant ainsi les œufs après adsorption (Chen et Hu, 2021) (**Figure 53**). D'autre part, *A. terreus* (OR250916) et *A. ustrus* (OR250163) agissent en dégradant le contenu des œufs en les détruisant, grâce à la production d'une variété de métabolites bioactifs, tels que des enzymes (lipase et protéase) *(*Ahmed *et al., 2020;* Kazeem *et al*., 2021; Popova *et al*., 2021; Yao *et al*., 2022), des peptides (Luo *et al*., 2019), et des composés volatils (Hung and Lee Rutgers, 2016) (**Figure 53**).

En plus de leur potentiel nématicide, les différents traitements bactériens ont permis d'améliorer la croissance des porte-greffes Citrange Carrizo et bigaradier. Cela peut s'expliquer par la production de divers composés tels que l'IAA, l'ammoniac, les polysaccharides et la solubilisation du phosphate, qui agissent directement dans la rhizosphère comme des agents de biocontrôle en modifiant les niveaux d'hormones végétales ou en réduisant le potentiel parasitaire des pathogènes (Turatto *et al*., 2018). Parmi les molécules impliquées dans ce mécanisme, il a été évoqué les sidérophores, l'IAA, les phénazines, les sessilines, les orfamides, les chitinases, les glucanases et les protéases (Dimkić *et al*., 2022). De même, l'inoculation avec *A. terreus* a réduit la population des nématodes de plus de 94% dans le sol rhizosphérique et de 78% dans les racines. En outre, les plants d'agrumes inoculés avec *F. mosseae* ont montré une croissance et une production de biomasse des pousses respectivement 1,85 et 1,69 fois supérieures à celles du témoin inoculé uniquement avec *T. semipenetrans,* et de 0,8 et 0,84 fois supérieures à celles du témoin non inoculé. Ces résultats peuvent être expliqués par la capacité de ces champignons à induire des mécanismes de défense des plantes contre les nématodes par la production d'éliciteurs qui activent la voie de la résistance systémique acquise (RSA) chez les plantes, entraînant la production de protéines PR (Elsherbiny *et al*., 2019), telles que les chitinases et les β-1,3-glucanases, capables de dégrader les composants de la paroi cellulaire des nématodes, provoquant ainsi leur mort, et par la modification de la composition des exsudats racinaires, qui servent de signaux de reconnaissance et de pénétration pour les nématodes (Vos *et al*., 2012). Cette modification peut entraîner une perturbation de la

communication entre les nématodes et les racines des plantes, limitant ainsi leur capacité à s'établir et à causer des dommages (**Figure 53**).

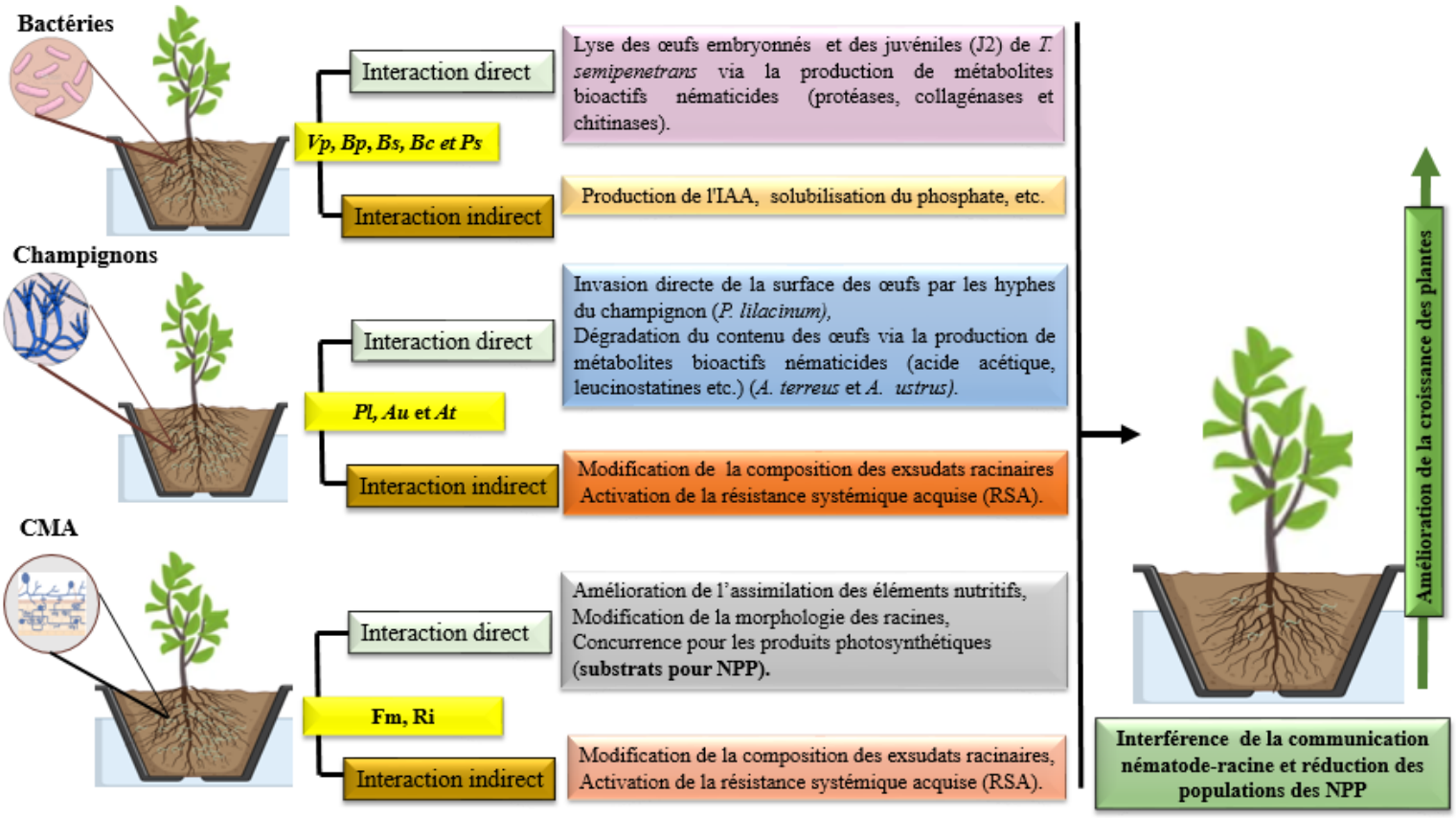


Figure 53. Schéma conceptuel illustrant les mécanismes d'action déployés par les bactéries (*V. paradoxus* (Vp), *B. pseudomycoide* (Bp), *P. speluncae* (ps), *B. simplex* (Bs) et *B. cereus* (Bc)), les champignons (*P. lilacinus* (Pl), *A. terreus* (At) et *A. ustus*(Au)), et et les champignons mycorhiziens (*F mosseae* (Fm) et *R. irrigularis* (Ri)) dans leur lutte contre *T. semipenetrans.*

6. Évaluation du potentiel nématicide de certaines Plantes Aromatiques et Médicinales

Le potentiel nématicide des huiles essentielles (HEs) et des extraits aqueux de sept plantes aromatiques et médicinales (PAM), *Rosmarinus officinalis, Chamaemelum nobile, Laurus nobilis, Verbena officinalis, Foeniculum vulgare, Moringa oleifera* et *Thymus vulgaris* a été examiné vis-à-vis du nématode des agrumes *T. semipenetrans*. Les HEs se sont révélées riches en eucalyptol (44 %), 4-propan-2-ylsulfonylbenzaldéhyde (20,47 %), α-Curcumène (38 %), trans-anéthole (63,10 %), acide palmitique (37,39 %) et carvacrol (72 %). Cependant, les extraits se sont avérés riches en acide carnosique (20,66 %), acide p-coumaroxyquinic B (50,92 %), epicatechin (12,61 %), Aucubin (15,85 %), Quercetin (65,85 %) et Feruloylquinic acid (23,02 %). Ces composés majeurs ont contribué à une forte activité nématicide en termes de

mortalité des J2 et d'inhibition de l'éclosion des œufs du nématode des agrumes *T. semipenetrans*.

L'efficacité des HEs a significativement varié en fonction des espèces de PAM, de la concentration en HEs et du temps d'incubation. En effet, à faible concentration (5 µl/ml), l'activité nématicide des HEs est assez faible chez toutes les PAM étudiées, soit des taux de mortalité des juvéniles (J2) variant entre 5% et 23% et une réduction de l'éclosion des œufs entre 0 et 69% après 24 et 48 heures d'incubation respectivement. En revanche, à la concentration de 20 µl/ml, les HEs des PAM étudiées sont dotés d'un très fort pouvoir nématicide se traduisant par une mortalité totale des J2 et une inhibition complète de l'éclosion des œufs après 96 et 144 heures d'incubation respectivement. Les HEs de thym (TV) et du romarin (RO) se sont révélées les plus toxiques pour les juvéniles de deuxième stade (J2) du nématode des agrumes *T. semipenetrans*. En effet, les HEs de ces deux espèces de PAM ont provoqué une mortalité de 100%à une concentration de 10 µl/ml après 96 heures d'incubation. L'efficacité nématicide élevée des huiles essentielles de *R. officinalis* et *T. vulgaris* peut être attribuée à la présence d'Eucalyptol (44%), β-Myrcène (13,86%), Linalool (9,30%) et Camphre (16,90%) comme principaux composants des HEs de *R. officinalis*, et au carvacrol (72%), β-caryophyllène (4,85%), β-cymène (5,80%), γ-terpinène (6,50%) et thymol (3,05%) comme constituants majeurs des HEs de *T. vulgaris*. En effet, D'Addabbo *et al*. (2020) et Brikci *et al*. (2021) ont rapporté que les composés naturels tels que β-phellandrène, fenchone, thymol et α-pinène extraits des plantes de la famille des *Lamiaceae*, inhibent la sécrétion de la carboxylase cible d'Acétyl CoA, une enzyme responsable de la synthèse des acides gras chez *T. semipenetrans*. Ces composés, présents dans les huiles essentielles de *R. officinalis* et *T. vulgaris*, pourraient jouer un rôle crucial dans leur activité hautement efficace contre *T. semipenetrans* observée dans la présente étude. D'autres composés des HEs peuvent agir sur d'autres tissus et organes des NPP, y compris le stylet, l'intestin et le pharynx (Geng *et al*. 2016). Oka (2001) a suggéré que les HEs perturbent la membrane cellulaire du nématode et modifient sa perméabilité (**Figure 54**). Selon Caboni *et al*. (2012), les aldéhydes insaturés (E, E)-2,4-décadiénal et (E)-2-décénal réagissent avec les groupes amino ou thiol de la cuticule du nématode, provoquant des dommages mécaniques importants et une fuite du fluide interne des nématodes (Caboni *et al*., 2012). De plus, les huiles essentielles peuvent induire un stress oxydatif, entraînant des modifications irréversibles de l'ADN, des protéines et des lipides (Ayaz *et al*., 2021), conduisant ainsi à une mortalité rapide des nématodes (Kalaiselvi *et al*., 2019).

En ce qui concerne les extraits aqueux. Nos résultats suggèrent que les extraits des sept PAM testées peuvent potentiellement servir pour le contrôle de nématode des agrumes *T. semipenetrans*. En effet, le traitement par les extraits des différentes plantes a provoqué un pourcentage de mortalité élevé (> 55%) *in vitro*, et à une stabilisation voire une diminution des populations des nématodes (Fr< 1,67) *in vivo*. Ces extraits se sont également révélés être des stimulateurs importants de la croissance des plantes. En effet, leur application a entrainé une amélioration significative de la croissance et de la production de biomasses chez les plantules de *Citrus volkameriana*. Le pouvoir nématicide des extraits des PAM étudiées a été significativement influencé par la concentration des extraits, la durée de la période d'incubation et par l'espèces de PAM. Les taux de mortalité les plus élevés (> 55%) ont été obtenus avec une incubation dans une concentration de 10% pendant 96h chez toutes les PAM étudiées. Les extraits de *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis* se sont avérés les plus actifs contre le nématode des agrumes. En effet, une solution à 10% des extraits de ces plantes a provoqué des taux de mortalité des juvéniles respectifs de 77,6% et 75,2% après 96 heures d'incubation et une inhibition totale de l'éclosion des œufs (0 œuf éclos) après 144 heures d'incubation. Les autres espèces de PAM ont également montré un effet nématicide important, mais significativement inférieur à celui des espèces précédentes, *Chamaemelum nobile* (72.5% de mortalité) *Moringa oleifera* (67%), *Laurus nobilis* (57.8%), *Foeniculum vulgare* (55.8%) et *Verbena officinalis* (55.4%). Ce pouvoir nématicide élevé des extraits de ces espèces de PAM a été également rapporté chez d'autres nématodes (Montasser *et al*., 2012) et serait principalement attribué à leur richesse en flavonoïdes, flavanols, acides phénoliques et d'autres composés bioactifs (Elzawahry *et al*., 2014). En effet, la quercétine, le flavone apigénine et kaempferol ont augmenté significativement la mortalité des juvéniles *de M. incognita* (Bano *et al*., 2020). De plus, les flavonoïdes ont également été associés à l'inhibition du développement larvaire (Morais-Costa *et al*., 2015), à l'inhibition de l'exuviation larvaire (Mengistu *et al*., 2017), à l'inhibition de la migration larvaire et à une réduction de la motilité des adultes de *H. contortus* (Féboli *et al*., 2016) (**Figure 54**).

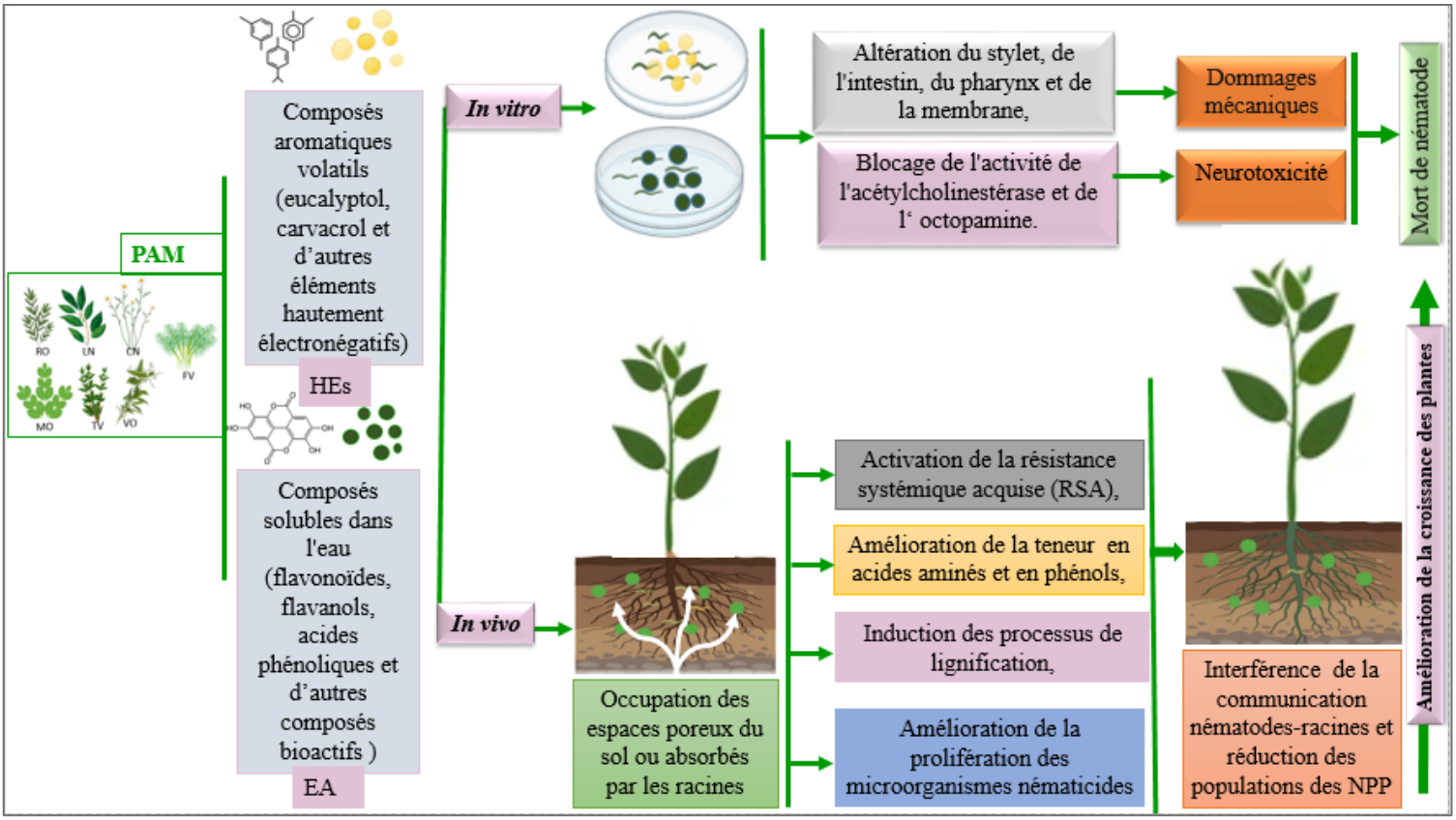


Figure 54. Schéma conceptuel détaillant les mécanismes d'action des huiles essentielles (HEs) et des extraits aqueux (EA) des PAM, *Rosmarinus officinalis (RO), Laurus nobilis (RN), Verbena officinalis (VO), Foeniculum vulgare (FV), Moringa oleifera (MO), Chamaemelum nobile (CN) et Thymus vulgaris (TV*) dans la lutte contre *T. semipenetrans in vitro* et *in vivo.*

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

De l'ensemble des expérimentations réalisées au cours de ce travail qui a pour objectif de développer des méthodes de lutte biologique vis-à-vis du nématode des agrumes *T. semipenetrans* plusieurs conclusions peuvent être dégagées :

Les NPP ont été observés dans les racines et le sol rhizosphérique de tous les porte-greffes étudiés et sous les différentes conditions pédoclimatiques des régions agrumicoles prospectées (Marrakech-Safi, Gharb, Beni Mellal-Khenifra, Berkane et Souss-Massa). Cependant, la prévalence, la densité et la diversité des NPP ont varié en fonction des conditions pédologiques caractérisant les régions prospectées. Onze genres et dix espèces de NPP ont ainsi été identifiés dans les différents échantillons de sol et de racines examinés. Globalement, les résultats montrent que certaines espèces de nématodes comme *T. semipenetrans* et certains genres comme *Helicotylenchus* sont omniprésents dans tous les sites et régions d'agrumes examinés. Cependant, d'autres espèces semblent être spécifiques à une région donnée voire même à un site donné comme les nématodes de lésions racinaires *Pratylenchus thornei* et *P. neglectus* qui n'ont été observées que dans la région de Berkane.

T. semipenetrans s'est avérée être l'espèce la plus abondante dans les matrices du sol et des racines de différentes régions agrumicoles étudiées. Ceci est probablement dû au fait que les conditions environnementales et pédologiques locales sont plus propices à cette espèce de NPP. En effet, à l'exception des sites de Balfa (région de Sous-Massa), de Souk Sebt (Région de BéniMellal), Sidi Slimane (région de Gharb) et Zegzel (région de Berkane) qui ont enregistré une prévalence de *T. semipenetrans* de 50%, tous les autres sites ont présenté des prévalences supérieures à 66,7%. Ce nématode a même atteint une prévalence de 100% dans les sites de Taroudant (région de Souss) et M'nasra (région de Gharb).

D'autres espèces de nématodes ont également été détectées telles que *Pratylenchus vulnus*, *Pratylenchus thornei*, *Scutellonema bradys*, *Helicotylenchus indicus*, et *Xiphinema diversicaudatum* ainsi que l'espèce *X. Americanum,* vecteur du virus de la mosaïque de l'arabette (ArMV) et du virus du court-noué de la vigne (GFLV). Cette dernière, signalée pour la première fois dans les vergers d'agrumes marocains, pourrait constituer une menace sérieuse pour la production agrumicole nationale.

La densité totale des NPP par région a été plus élevée dans la région de Beni Mellal Khenifra, avec 2451 nématodes/100 g de sol et 20 g de racines, suivie par la région de Marrakech-Safi (2064 nématodes/100g de sol et 20g de racines) et de Berkane (1935

nématodes/100g de sol et 20g de racines). Tandis que la région de Souss Massa a montré la densité totale la plus faible, avec seulement 207 nématodes/100 g de sol et 20 g de racines.

La répartition et l'abondance des NPP est influencées par les paramètres physico chimiques des sols. Dans l'ensemble, la densité totale des nématodes phytoparasites a montré une corrélation négative avec le carbone et la teneur en matière organique et une corrélation positive avec l'humidité du sol.

D'une manière générale, les agrumes sont plus sujets à l'infestation par les NPP au printemps lorsqu'ils sont cultivés sur un sol sableux-limoneux, humide (> 44,51%), ayant un pH entre 7,52 et 7,85, pauvre en matière organique (0,07%), notamment lorsqu'ils sont greffés sur le Bigaradier, cultivés en absence de cultures associées et bien fertilisés. Ils sont, au contraire, moins infestés en été lorsqu'ils sont cultivés sur le porte-greffe *Citrange Carrizo*, dans un sol sableux- limoneux, humide (12,47%-33,81%), à un pH variant entre 7,49 et 8,27, riche en matière organique (1,99%), en présence de cultures associées et sans traitements fertilisants.

Les porte-greffes d'agrumes présentent une résistance variable à *Tylenchulus semipenetrans*, *Citrange* étant le plus résistant *Carrizo* (0,33 femelles par cm de racine). *Citrange Troyer*, Citrange 35 et *Citrus macrophylla* ont également montré une certaine tolérance, tandis que le bigaradier, Bigaradier australien et *Citrus volkameriana* ont été les plus sensibles à *T. semipenetrans* (> 3 de femelles par cm de racines). En réponse à l'infestation par les NPP les plantes d'agrumes subissent des changements physiologiques et biochimiques importantes, notamment une stimulation du métabolisme antioxydant pour faire face au stress oxydatif engendré par ce parasite.

Dans le but de sélectionner des microorganismes antagonistes à *T. semipenetrans*, l'analyse du microbiome associé à la rhizosphère des agrumes a mis en évidence l'existence d'une grande richesse et diversité en microorganismes (127 isolats fongiques, 106 isolats bactériens et 4 genres (7 morphotypes) de champignons mycorhiziens) dont certains présentent une importante activité nématicide contre *T. semipenetrans*. Parmi les genres de CMA trouvés, *Glomus* est le plus abondant suivi par *Rhizophagus* et *Acaulospora*.

Le criblage sélectif des microorganismes rhizosphériques a activité nématicides a révélé que cinq souches bactériennes, *Variovorax paradoxus* (OQ651063), *Bacillus pseudomycoides* (OQ652044), *Bacillus simplex* (OQ651985), *Bacillus cereus* (OQ651999), et *Paracoccus*

speluncae (OQ652010), et trois souches fongiques, *Paecilomyces lilacinus*, *Aspergillus ustus* (OR250163) et *Aspergillus terreus* (OR250916) ont montré une activité nématicide importante contre *Tylenchulus semipenetrans* à la fois in *vitro* et *in vivo* sur les portes greffes *Citrus aurantium* et *Citrange Carrizo.* De même, les champignons mycorhiziens arbusculaires *Funneliformis mosseae* et *Rhizophagus irregularis* ont provoqué une réduction significative de la population de *T. semipenetrans* aussi bien dans le sol rhizosphérique que dans les racines de ces porte-greffes. En plus, l'inoculation des porte-greffes d'agrumes *Citrus aurantium* et *Citrange Carrizo* par ces souches bactériennes et fongiques ainsi que par les CMA *F. mosseae* et *R. irregularis* a entraîné une amélioration significative de la croissance et la production de biomasse des racines et des tiges.

Les filtrats de culture liquide de ces bactéries et ces mycètes ont également montré une activité nématicide importante contre *T. semipenetrans*, suggérant qu'au cours de leur développement normal, ces microorganismes antagonistes fabriquent des molécules bioactives toxiques pour *T. semipenetrans* qui pourraient être utilisées pour développer de nouveaux nématicides biologiques contre ce nématode.

D'autre part, parmi les plantes aromatiques et médicinales testées, *R. officinalis* et *T. vulgaris* ont présentés une forte toxicité contre *T. semipenetrans* avec des valeurs de DL50 inférieures à 6 µl/ml pour les huiles essentielles et à 7 % pour les extraits aqueux.

En définitif, cette étude montre clairement que l'inoculation par les souches bactériennes et fongiques ainsi que par les CMA identifiés pour leur potentiel nématicide, l'application de leur filtrat ou leur utilisation pour le développement et la formulation de nématicides biologiques, de même que l'utilisation des HEs et des extraits aqueux des PAM, constituent des alternatives efficaces aux nématicides chimiques aux effets nocifs pour l'environnement et les consommateurs. Ils pourraient être développés et formulés pour être utilisés comme stratégies de lutte durable permettant aux agriculteurs de maintenir une production et une qualité élevées tout en prévenant l'impact environnemental.

Tenant compte des résultats obtenus, et dans le but de continuer et d'optimiser ce travail nous citons comme perspectives :

L'identification classique et moléculaire de tous les micro-organismes isolés à partir de racines et de sols des agrumes afin d'enrichir la bactériothéque et la mycothèque de notre laboratoire :

Cette perspective s'oriente vers la caractérisation classique des bactéries et champignons (caractéristiques morphologiques et des tests biochimiques) et moléculaire (16S), autres que celles présentant des propriétés nématicides, isolées des racines et des sols des vergers d'agrumes fourniront une ressource précieuse pour le partage avec d'autres laboratoires, et pour des études fonctionnelles ultérieures visant à comprendre les rôles potentiels de ces micro-organismes dans le sol et les racines des agrumes. En identifiant les souches présentant des caractéristiques bénéfiques, cette démarche ouvre la voie au développement de bioinoculants pour une gestion durable des cultures agricoles.

Culture monosporale, identification moléculaire des spores isolées et lancement des essaies afin de déterminer les conditions qui optimisent l'aptitude prophylactique des mycorhizes à réduire la gravité des attaques des nématodes :

La mise en œuvre de la culture monosporale, qui génère des spores pures de champignons mycorhiziens, permet une identification moléculaire précise des spores isolées. Cette caractérisation offre un aperçu détaillé de la diversité génétique des mycorhizes. Parallèlement, des essais expérimentaux sont essentiels pour évaluer l'efficacité prophylactique des mycorhizes. L'expression de cette capacité prophylactique est influencée par de nombreux facteurs, y compris la nature de la plante hôte, du champignon mycorhizogène, du nématode et des conditions environnementales. Par exemple, la disponibilité des nutriments, la température et le taux de fertilisation du sol peuvent tous influencer le potentiel prophylactique des mycorhizes. Ainsi, pour optimiser la capacité prophylactique des mycorhizes, il est nécessaire de comprendre ces interactions complexes et de déterminer les conditions qui favorisent l'expression de cette capacité.

Application des différents bactéries et champignons nématicides à grande échelle (dans les vergers) :

L'application à grande échelle de bactéries et de champignons nématicides, spécifiquement isolés et testés pour leur activité nématicide contre *T. semipenetrans*, nécessite une approche méthodique : 1) La production en masse de ces agents tout en maintenant leur qualité et leur viabilité. 2) la formulation, qui comprend des composants de soutien, et vise à assurer la stabilité des agents nématicides lors de l'application. 3) l'application elle-même, qu'elle se fasse par la pulvérisation ou l'incorporation dans le sol, tout en garantissant une

distribution uniforme des agents nématicides. Une évaluation continue des populations de NPP et de la santé des agrumes est effectuée pour ajuster les stratégies au fil du temps.

Déterminer la ou les fractions et la ou les molécules bioactives de chaque filtrat de la culture liquide de nos antagonistes :

Le processus de détermination des fractions et des molécules bioactives à partir du filtrat de culture liquide de nos antagonistes (bactéries et champignons) suit une approche systématique. Tout d'abord, le filtrat de culture est fractionné pour déterminer la fraction ayant la plus forte activité nématicide (fraction protéique, fraction lipidique et fraction phénolique). Chaque fraction est ensuite testée pour son activité nématicide contre les nématodes. Les fractions qui montrent une activité nématicide significative sont ensuite analysées pour identifier les molécules bioactives. Cela peut être réalisé en utilisant différentes techniques d'analyse, telles que la spectrométrie de masse (GC-MS et HPLC-MS), la résonance magnétique nucléaire (RMN), etc.

Étudier les mécanismes d'action des molécules bioactives de chaque filtrat de la culture liquide de chaque antagoniste :

L'exploration des mécanismes d'action des molécules bioactives est une démarche cruciale pour élucider la manière dont ces agents exercent leurs effets nématicide. Cette démarche peut être réalisée par plusieurs moyens : 1) Études histologiques de NPP pour révéler les altérations morphologiques dans les tissus internes des nématodes phytoparasites (NPP) induites par les molécules bioactives, 2) L'analyse de la perméabilité cellulaire, réalisée à l'aide de marqueurs fluorescents, pour évaluer la perméabilité cellulaire des nématodes après exposition aux molécules bioactives, 3) Études d'expression génique (RT-qPCR,) pour déterminer les changements dans l'expression de gènes liés aux processus biochimiques spécifiques. 3) Analyses des changements biochimiques induites par les molécules bioactives chez les NPP. Cela peut inclure l'analyse des protéines totales, des sucres, des acides aminés, ou des lipides par chromatographie ou spectroscopie RMN.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aballay, E., Prodan, S., Mårtensson, A., and Persson, P. (2012). Assessment of rhizobacteria from grapevine for their suppressive effect on the parasitic nematode *Xiphinema index*. *Crop Protection, 42*, 36-41.

Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Entomol, 18*(2), 265-267.

Abdelaziz, A. M., El-Wakil, D. A., Hashem, A. H., Al-Askar, A. A., AbdElgawad, H., and Attia, M. S. (2023). Efficient role of endophytic *Aspergillus terreus* in biocontrol of *Rhizoctonia solani* causing damping-off disease of *Phaseolus vulgaris* and *Vicia faba*. *Microorganisms, 11*(6), 14-87.

Abdel-Baset, S. H. (2020). Effect of intercropping onion with sugar beet on productivity of both crops and root-knot nematodes control under different onion plant densities and slow-release N fertilizer rates. *Journal of Plant Production Sciences, 9*(1), 61-75.

Abd-Elgawad, M., El-Mougy, N. S., Abdel-Kader, M. M., El-Gamal, N., and Mohamed, M. (2010). Protective treatments against soilborne pathogens in citrus orchards. *Journal of Plant Protection Research*, 50(4), 478-484

Abd-Elgawad, M., Koura, F., Montasser, S., Hammam, M., and El-bahrawy, A. (2016). Long-term effect of *Tylenchulus semipenetrans* on citrus tree quality in reclaimed land of Egypt. *Egyptian Journal of Agronematology, 15*(1), 53-66.

Abd-Elgawad, M. M. M. (2020). Managing nematodes in Egyptian citrus orchards. *Bulletin of the National Research Centre, 44*(1), 2-15.

Abdel-Sattar, M., and Hammad, S. E. (2022). Eco-friendly management of citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans*) using ozone, copper sulphate and calcium sulphate and its impact on productivity of lemon trees. *Horticulture, Environment, and Biotechnology, 63*(6), 779-792.

Abokorah, M., and Elsebaay, W. (2022). Plant parasitic nematodes associated with fruit trees in the newly reclaimed soils at El-Sadat province, Menoufia Governorate. *Egyptian Journal of Agronematology, 21*(1), 1-13.

Abu Habib, A. H. A., Younes, H. A., Ibrahim, I. K. A., and Khalil, A. E. (2020). Plant parasitic nematodes associated with citrus trees and reaction of two citrus cultivars to *Tylenchulus semipenetrans* in northern Egypt. *Journal of the Advances in Agricultural Researches, 25*(2), 166-175.

Abu Habib, A., Younes, H., Ibrahim, I., and Khalil, A. (2020). Plant Parasitic nematodes associated with citrus trees and reaction of two citrus cultivars to *Tylenchulus semipenetrans* in northern Egypt. *Journal of the Advances in Agricultural Researches, 25*(2), 166-175.

Adam, M., Heuer, H., Ramadan, E. M., Hussein, M. A., and Hallmann, J. (2013). Occurrence of plant-parasitic nematodes in organic farming in Egypt. *Int. J. Nematol, 23(1)*, 82-90.

Afzal, M. U., Khan, S. A., Javid, N., and Malik, A. U. (2021). Synergism of citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans* Cobb.) and *Colletotrichum gloeosporioides* plays a major role in citrus dieback. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 58*(4), 1291-1299.

Agrios, G. N. (2005). Plant Disease Caused by Fungi, in: Agrios GN (ed.) *Plant Pathology*, 24(6), 386-615.

Agustí, M., Mesejo, C., Reig, C., and Martínez-Fuentes, A. (2014). Citrus production. *Horticulture: plants for people and places, 1(3)*, 159-195.

Ahmad, F., Rather, M. A., and Siddiqui, M. A. (2010). Nematicidal activity of leaf extracts from Lantana camara L. against *Meloidogyne incognita* (kofoid and white) chitwood and its use to manage roots infection of *Solanum melongena* L. *Brazilian archives of biology and technology*, *53(3)*, 543-548.

Ahmad, M. S., Mukhtar, T., and Ahmad, R. (2004). Some studies on the control of citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans*) by leaf extracts of three plants and their effects on plant growth variables. *Asian Journal of Plant Sciences*, 3(5), 544-548.

Ahmed, E. M., Omer, N. M., and Almaleeh, T. A. (2022). Field Survey and Identification of Nematodes Associated with Citrus Trees in Dalanj Area, Sudan. *Asian Journal of Research and Review in Agriculture*, 4(1), 43-50.

Ahmed, N. E., El Shamy, A. R., and Awad, H. M. (2020). Optimization and immobilization of amylase produced by Aspergillus terreus using pomegranate peel waste. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 1-12.

Al-Ani, L., Soares, F., Sharma, A., de los Santos-Villalobos, S., Valdivia-Padilla, A., and Aguilar-Marcelino, L. (2022). Strategy of nematophagous fungi in determining the activity of plant parasitic nematodes and their prospective role in sustainable agriculture. *Frontiers in Fungal Biology*, 3(8), 1–9.

Al-Hazmi, A. S., Abul-Hayja, Z. M., and Trabulsi, I. Y. (1983). Plant parasitic nematodes in Al-Kharj region of Saudi Arabia. *Nematologia Mediterranea*. 11(2), 209-212.

Ali, A. A. I., El-Ashry, R. M., and Aioub, A. A. A. (2022). Animal manure rhizobacteria co-fertilization suppresses phytonematodes and enhances plant production : Evidence from field and greenhouse. *Journal of Plant Diseases and Protection*, *129*(1), 155-169.

Ali, N. (2015). Communautés de nématodes phytoparasites associés à l'olivier : Réponse aux forçages anthropiques et environnementaux. Thèse de doctorat. Montpellier SupAgro, 343p.

AL-Khazraji, E. H. A., and Hanawi, M. J. (2022). The antagonistic effect of biocontrol agents *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* on the citrus nematode *Tylenchulus semipentrans*. *Teikyo medical journal*. *45*(03), 6021-6028.

Alejo-Armijo, A., Tello-Abolafia, A., Salido, S., and Altarejos, J. (2019). Phenolic compounds in laurel wood : a new source of proanthocyanidins. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, *39*(6), 436-453.

Alzubi, E., Shbikat, N., and Noche, B. (2023). A system dynamics model to improving sustainable performance of the citrus farmers in Jordan Valley. *Cleaner Production Letters*, *4*, 100034.

Andrés, M. F., González-Coloma, A., Sanz, J., Burillo, J., and Sainz, P. (2012). Nematicidal activity of essential oils . *Phytochemistry Reviews*, *11(6)*, 371-390.

ASPAM. (2023). Association des producteurs d'agrumes du Maroc. *Division des Statistiques, Maroc.* Available online: www.maroc-citrus.com (accessed on 3 January 2022).

ADA. (2019). Agency for Agricultural. Development Investor's Guide in the Agricultural Sector in Morocco. 2019. Available online: www.ada.gov.ma (accessed on 7 January 2022).

Assouguem, A., Kara, M., Benmessaoud, S., Mechchate, H., Eljabboury, Z., Farah, A., and Lazraq, A. (2021). Tropical Journal of Natural Product Research *Ceratitis capitata* Wiedemann (*Diptera : Tephritidae*) in Moroccan Citrus orchards: Chemical and Sustainable Control Methods and Priorities for Future Research. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 5(10), 1703-1708.

Assouguem, A., Kara, M., Mechchate, H., AlZain, M. N., Noman, O. M., Imtara, H., Hano, C., Ibrahim, M. N., Benmessaoud, S., and Farah, A. (2021). Evaluation of the effect of different concentrations of spirotetramat on the diaspine scale parlatoria ziziphi in citrus orchards. *Agronomy*, *11*(9), 1840.

Aubert, G. (1978). *Méthodes d'analyses des sols*. Centre national de documentation pédagogique, CRDP Marseille, 191 p.

Avato, P., Laquale, S., Argentieri, M. P., Lamiri, A., Radicci, V., and D'Addabbo, T. (2017). Nematicidal activity of essential oils from aromatic plants of Morocco. *Journal of pest science*, *90*, 711-722.

Ayazpour, K., Hasanzadeh, H., and Arabzadegan, M. S. (2010). Evaluation of the control of citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans*) by leaf extracts of many plants and their effects on plant growth. *African Journal of Agricultural Research*, *5*(14), 1876-1880.

Ayilara, M. S., Adeleke, B. S., Akinola, S. A., Fayose, C. A., Adeyemi, U. T., Gbadegesin, L. A., Omole, R. K., Johnson, R. M., Uthman, Q. O., and Babalola, O. O. (2023). Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides : A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1040901.

Babaali, D., Roeb, J., Hammache, M., and Hallmann, J. (2017). Nematicidal potential of aqueous and ethanol extracts gained from *Datura stramonium, D. innoxia and D. tatula* on *Meloidogyne incognita*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, *124*(4), 339-348.

Badii, K. B., Billah, M. K., Afreh-Nuamah, K., Obeng-Ofori, D., and Nyarko, G. (2015). Review of the pest status, economic impact and management of fruit-infesting flies (*Diptera : Tephritidae*) in Africa. Biomolecules, 10(1), 98.

Baermann, G. (1917). Eine einfache methode zur auffindung von Ancylostomum (Nematoden) larven in erdproben. *Geneeskd Tijdschr Ned Indie*, *57*, 131-137.

Baines, R. C., Miyakawa, T., Cameron, J. W., and Small, R. H. (1969). Infectivity of two biotypes of the citrus nematode on citrus and on some other hosts. *Journal of Nematology*, *1*(2), 150.

Baines, R., Gundy, S., and Sher, S. (1959). Citrus and avocado nematodes : Spread by nursery stock, by contaminated implements, and by water from irrigation canals that may drain infested land. *California Agriculture*, *13*(9), 16-18.

Bali, S., Kaur, P., Jamwal, V. L., Gandhi, S. G., Sharma, A., Ohri, P., Bhardwaj, R., Ali, M. A., and Ahmad, P. (2020). Seed Priming with Jasmonic Acid Counteracts Root

Knot Nematode Infection in Tomato by Modulating the Activity and Expression of Antioxidative Enzymes. *Biomolecules*, *10*(1), 98.

Banerjee, N., and Hallem, E. A. (2020). The role of carbon dioxide in nematode behaviour and physiology. *Parasitology*, *147*(8), 841-854.

Bano, S., Iqbal, E. Y., Lubna, Zik-ur-Rehman, S., Fayyaz, S., and Faizi, S. (2020). Nematicidal activity of flavonoids with structure activity relationship (SAR) studies against root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *European Journal of Plant Pathology*, *157*(2), 299-309.

Barbano, D. M., Clark, J. L., Dunham, C. E., and Flemin, R. J. (1990). Kjeldahl method for determination of total nitrogen content of milk : Collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, *73*(6), 849-859.

Barberis, M., Calabrese, D., Galloni, M., and Nepi, M. (2023). Secondary Metabolites in Nectar-Mediated Plant-Pollinator Relationships. *Plants*, *12*(3), 550.

Barboni, T. (2006). Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. Thèse de doctorat. Université Pascal Paoli, 283p.

Barnett, H. L., and Hunter, B. B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. *Illustrated genera of imperfect fungi*, 3rd ed. 241 p

Barros, A. F., Campos, V. P., da Silva, J. C. P., Pedroso, M. P., Medeiros, F. H. V., Pozza, E. A., and Reale, A. L. (2014). Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. *Applied Soil Ecology*, *80(10)*, 34-43.

Bartels, D., and Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in plant sciences*, *24*(1), 23-58.

Barua, A., McDonald-Howard, K.-L., Mc Donnell, R. J., Rae, R., and Williams, C. D. (2020). Toxicity of essential oils to slug parasitic and entomopathogenic nematodes. *Journal of Pest Science*, *93(2)*, 1411-1419.

Barkley, N. A., Roose, M. L., Krueger, R. R., and Federici, C. T. (2006). Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and applied genetics*, *112*(8), 1519-1531.

Baslam, M., Qaddoury, A., and Goicoechea, N. (2014). Role of native and exotic mycorrhizal symbiosis to develop morphological, physiological and biochemical responses coping with water drought of date palm, *Phoenix dactylifera*. *Trees*, *28*(1), 161-172.

Belabdelli, F., Piras, A., Bekhti, N., Danilo, F., Belmokhtar, Z., and Merad, Y. (2020). Chemical Composition and Antifungal Activity of *Foeniculum vulgare* Mill. *Chemistry Africa*, 3, 323-328.

Beniken, L., Beqqali, M., Dahan, R., Benkirane, R., Omari, F. E., Benazouz, A., Benyahia, H., and Gaboun, F. (2011). Évaluation de la résistance de dix porte-greffes d'agrumes résistants à la tristeza vis-à-vis du déficit hydrique. *Fruits*, *66*(6), 373 - 384.

BENSBAHOU, A., KERKOUCH, A., and ELOTMANI, B. (2020). L'impact du changement climatique sur la production agricole : Cas de la région Souss-Massa. *Alternatives Managériales Economiques*, *2*(4), 468-484.

Benyahia, H., Talha, A., Fadli, A., Chetto, O., Omari, F. E., and Beniken, L. (2017). Performance of 'Valencia Late' Sweet Orange (Citrus sinensis) on different rootstocks in the Gharb Region (Northwestern Morocco). *Annual Research and Review in Biology*, 1-11.

Bergman, I., and Loxley, R. (1970). The determination of hydroxyproline in urine hydrolysates. *Clinica Chimica Acta*, *27*(2), 347-349.

Bertin, Y., Didier, C., Ducelier, D., Grisoni, M., Pruvost, O., and Quilici, S. (1993). *La culture des agrumes à l'île de la Réunion*. CIRAD-FLHOR. 144 p

Bhagawati, B., Choudhary, B. N., and Kurulkar, U. (2021). Bio Management of Citrus Nematode, Tylenchulus semipenetrans infecting Citrus in Assam. *Indian Journal of Nematology*, *51*(2), 123-128.

Bhat, A. A., Shakeel, A., Waqar, S., Handoo, Z. A., and Khan, A. A. (2023). Microbes vs. Nematodes : Insights into Biocontrol through Antagonistic Organisms to Control Root-Knot Nematodes. *Plants*, 12(3), 451.

Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L. M., Vida, J. T., and Thomas, W. K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, *392*(6671), 71-75.

B\laszkowski, J., Kovács, G. M., Gáspár, B. K., Balázs, T. K., Buscot, F., and Ryszka, P. (2012). The arbuscular mycorrhizal Paraglomus majewskii sp. Nov. Represents a distinct basal lineage in Glomeromycota. *Mycologia*, *104*(1), 148-156.

Botton, B., Breton, A., and Fèvre, M. (1990). *Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle*. Masson Paris, 426p.

Borrás-Linares, I., Stojanović, Z., Quirantes-Piné, R., Arráez-Román, D., Švarc-Gajić, J., Fernández-Gutiérrez, A., and Segura-Carretero, A. (2014). *Rosmarinus officinalis* leaves as a natural source of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(11), 20585-20606.

Bowman, K. D., and Joubert, J. (2020). Citrus rootstocks. In *The Genus Citrus* (p. 105-127).

Bozbuga, R., Yildiz, S., Yuksel, E., Özer, G., Dababat, A. A., and İmren, M. (2022). Nematode-citrus plant interactions : Host preference, damage rate and molecular characterization of Citrus root nematode *Tylenchulus semipenetrans*. *Plant Biology*, 25(6), 871-879.

Briar, S. S., Grewal, P. S., Somasekhar, N., Stinner, D., and Miller, S. A. (2007). Soil nematode community, organic matter, microbial biomass and nitrogen dynamics in field plots transitioning from conventional to organic management. *Applied Soil Ecology*, *37*(3), 256-266.

Brikci, S. B., Abdelli, I., Hassani, F., and Reguig, M. B. (2021). Impact of essential oils of *lamiaceae* family against *Tylenchulus semipenetrans*. *Indian Journal of Ecology*, *48*(3), 716-721.

Bilia, A. R., Giomi, M., Innocenti, M., Gallori, S., and Vincieri, F. F. (2008). HPLC–DAD–ESI–MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *46*(3), 463-470.

Brown, J. G., and Lilleland, O. (1946). Rapid determination of potassium and sodium in plant materials and soil extracts by flame photometry. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, *48*(5), 341-346.

Bucki, P., Qing, X., Castillo, P., Gamliel, A., Dobrinin, S., Alon, T., and Braun Miyara, S. (2020). The genus *Pratylenchus* (*Nematoda : Pratylenchidae*) in Israel: From taxonomy to control practices. *Plants*, *9*(11), 1475.

CABI. (2021). *Tylenchulus semipenetrans* (citrus root nematode). *CABI Compendium*, *CABI Compendium*, 61059. https://doi.org/10.1079/cabicompendium.61059

Cadet, P., Thioulouse, J., and Albrecht, A. (1994). Relationships between ferrisol properties and the structure of plant parasitic nematode communities on sugarcane in Martinique (French West Indies). *Acta ØEcologica*, *15*(6), 767-780.

Campos, H. D., and Campos, V. P. (2005). Studies on inoculum, inoculation and extraction of root-knot nematodes, Meloidogyne javanica. *Nematologia Brasileira*, *29*(1), 75-82.

Castaneda-Alvarez, C., and Aballay, E. (2016). Rhizobacteria with nematicide aptitude : Enzymes and compounds associated. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *32*(12), 203.

Castillo, E., Martinelli, F., Zakharov-Negre, F., Ebeler, S. E., Buzo, T. R., McKenry, M. V., and Dandekar, A. M. (2017). Effects of transgenic expression of Brevibacterium linens methionine gamma lyase (MGL) on accumulation of *Tylenchulus semipenetrans* and key aminoacid contents in Carrizo citrange. *Plant Molecular Biology*, *95*(4), 497-505.

Castle, W. S., Bowman, K. D., Grosser, J. W., Futch, S. H., and Graham, J. H. (2016). Florida citrus rootstock selection guide:SP248/HS1260, rev. 12/2019. EDIS, 2020(1).

Chagas, A. C. S. (2015). Medicinal plant extracts and nematode control. *CABI Reviews*, *2015*, 1-8.

Chance, B., and Maehly, A. E. (1957). Methods in Enzymol. *by SP Colowick and NO Kaplan, Academic Press, Inc., New York*, *4*, 273.

Chandra, P., Singh, A., Prajapat, K., Rai, A. K., and Yadav, R. K. (2022). Native arbuscular mycorrhizal fungi improve growth, biomass yield, and phosphorus nutrition of sorghum in saline and sodic soils of the semi–arid region. *Environmental and Experimental Botany*, *201(8)*, 104982.

Chen, J., Li, Q. X., and Song, B. (2020). Chemical Nematicides : Recent Research Progress and Outlook. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(44), 12175-12188.

Chen, W., and Hu, Q. (2021). Secondary Metabolites of *Purpureocillium lilacinum. Molecules*, *27*(1), 18.

Chitwood, D. J. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual review of phytopathology*, *40*(1), 221-249.

CLARK, R. S. (1959). The nature and fungitoxicity of amino acid addition products of caffeic and chlorogenic acid. Thèse de doctorat. Purdue University.

Cobb, N. A. (1913). Notes on *Mononchus* and *Tylenchulus*. *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 3(10), 287-288.

Cohn, E. (1965). The development of the citrus nematode on some of its hosts 1. *Nematologica*, *11*(4), 593-600.

Cohn, E. (1969). The Occurrence and Distribution of Species of *Xiphinema* and *Longidorus* in Israel 1). *Nematologica*, *15*(2), 179-192.

Coyne, D. L., Nicol, J. M., Claudius-Cole, B., and Quénéhervé, P. (2010). *Les nématodes des plantes : Un guide pratique des techniques de terrain et de laboratoire*.

Cruz-Magalhães, V., Guimarães, R. A., da Silva, J. C., de Faria, A. F., Pedroso, M. P., Campos, V. P., Marbach, P. A., de Medeiros, F. H., and De Souza, J. T. (2022). The combination of two *Bacillus* strains suppresses *Meloidogyne incognita* and fungal pathogens, but does not enhance plant growth. *Pest Management Science*, *78*(2), 722-732.

D'Addabbo, T., Argentieri, M. P., Laquale, S., Candido, V., and Avato, P. (2020). Relationship between chemical composition and nematicidal activity of different essential oils. *Plants*, *9*(11), 1546.

D'Addabbo, T., Ladurner, E., and Troccoli, A. (2023). Nematicidal Activity of a Garlic Extract Formulation against the Grapevine Nematode *Xiphinema index*. *Plants*, 12(4), 739.

Dall'Acqua, S., Cervellati, R., Speroni, E., Costa, S., Guerra, M. C., Stella, L., Greco, E., and Innocenti, G. (2009). Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of *Laurus nobilis* L. Leaf Infusion. *Journal of Medicinal Food*, *12*(4), 869-876.

D**ambier, D., Benyahia, H., Pensabene-Bellavia, G., Aka Kaçar, Y., Froelicher, Y., Belfalah, Z., Lhou, B., Handaji, N., Printz, B., and Morillon, R. (2011).** Somatic hybridization for citrus rootstock breeding : An effective tool to solve some important issues of the Mediterranean citrus industry. *Plant cell reports*, *30*(5), 883-900.

Damodaran, T., Kumar, N., and Kavino, M. (2009). Breeding and evaluation of Musa hybrids resistant to *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense race 1. *Fruits*, *64*(1), 3-12.

Daramola, F. Y., Malgas, R., and Malan, A. P. (2021). Occurrence and seasonal changes in the population of root-knot nematodes on honeybush (sp.). *Helminthologia*, *58*(2), 202-212.

De Campos, A. S., Dos Santos, J. M., and Duncan, L. W. (2002). Nematodes of citrus in open nurseries and orchards in Sao Paulo State, Brazil. *Nematology*, *4*(2), 263-264.

De Grisse, A. T. (1969). Redescription ou modification de quelques techniques utilisées dans l'étude des nématodes phytoparasitaires. *Mededelingen van de Rijks Faculteit Landbouwwetenschappen Gent*, 34(2), 351.

Defez, R., Andreozzi, A., and Bianco, C. (2017). Quantification of triphenyl-2H-tetrazoliumchloride reduction activity in bacterial cells. Bio-protocol, 7(2), e2115-e2115.

De Ley, P., Felix, M.-A., Frisse, L., Nadler, S., Sternberg, P., and Thomas, W. K. (1999). Molecular and morphological characterisation of two reproductively isolated species with mirror-image anatomy (Nematoda : Cephalobidae). *Nematology*, *1*(6), 591-612.

Degenkolb, T., and Vilcinskas, A. (2016). Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as alternatives for biological control. Part II : Metabolites from nematophagous basidiomycetes and non-nematophagous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(9), 3813-3824.

Deka, R., Sinha, A. K., and Neog, P. P. (2003). Pathogenicity of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans* on Citrus jambhiri. *Indian Journal of Nematology*, *33*(1), 63-64.

Deng, X., Wang, X., and Li, G. (2022). Nematicidal effects of volatile organic compounds from microorganisms and plants on Plant-parasitic nematodes. *Microorganisms*, *10*(6), 1201.

Desaeger, J., Wram, C., and Zasada, I. (2020). New reduced-risk agricultural nematicides—Rationale and review. *Journal of Nematology*, 52(1), 1-16.

Di Bitetti, M. S. (2000). The distribution of grooming among female primates : Testing hypotheses with the Shannon-Wiener diversity index. *Behaviour*, *137*(11), 1517-1540.

Dihingia, S., Das, D., and Bora, S. (2017). Effect of microbial secretion on inhibitory effect of phytonematode : A review. *International Journal of Information Research and Review*, *4*(07), 4275-4280.

Dimkić, I., Janakiev, T., Petrović, M., Degrassi, G., and Fira, D. (2022). Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms—A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *117*, 101754.

Djian-Caporalino, C., Védie, H., and Arrufat, A. (2009). Gestion des nématodes à galles : Lutte conventionnelle et luttes alternatives. L'atout des plantes pièges. *Phytoma*, *624*, 21-25.

Doyle, J. J., and Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*. 19(1), 11-15.

Dobroslavić, E., Elez Garofulić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., and Dragović-Uzelac, V. (2021). Polyphenolic characterization and antioxidant capacity of *Laurus nobilis* L. leaf extracts obtained by green and conventional extraction techniques. *Processes*, *9*(10), 1840.

Dugrand-Judek, A. (2015). Contribution à l'étude phytochimique et moléculaire de la synthèse des coumarines et furocoumarines chez diverses variétés d'agrumes du genre *Citrus*. Thèse de doctorat. Université de Lorraine, 286p.

Duncan, L. W. (2000). Florida citrus pest management guide : Nematodes. University of Florida Cooperative Extension Service, *University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS.*

Duncan, L. W. (2005). Nematode parasites of citrus. In Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. *CABI Publishing Wallingford UK*, 437-466.

Duncan, L. W. (2009). Managing nematodes in citrus orchards. Integrated management of fruit crops nematodes. *Springer Science+ Business Media BV*, 135-174.

Duncan, L. W., and Cohn, E. (1990). Nematode parasites of citrus. *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. 321-346.*

Duncan, L. W., and Eissenstat, D. M. (1993). Responses of *Tylenchulus semipenetrans* to citrus fruit removal : Implications for carbohydrate competition. *Journal of Nematology*, *25*(1), 7.

Duncan, L. W., Inserra, R. N., O'Bannon, J. H., and El-Morshedy, M. M. (1994). Reproduction of a Florida population of *Tylenchulus semipenetrans* on resistant citrus rootstocks. *Plant Disease*, *78*(11), 1067-1071.

Eapen, S. J., Beena, B., and Ramana, K. V. (2005). Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, *88*(3), 218-225.

Eisvand, P., Nejad, R. F., and Azimi, S. (2019). Plant parasitic nematodes fauna in citrus orchards in Khuzestan province, Southwestern Iran. *Hellenic Plant Protection Journal*, *12*(2), 97-107.

El Kantar, S. (2018). Valorisation des coproduits issus des industries d'agrumes : Extraction des molécules bioactives par des technologies innovantes. Thèse de doctorat. Université de Technologie de Compiègne; Université Saint-Joseph (Beyrouth). Faculté des Sciences, 227p.

El-Ashry, R. M., Aioub, A. A. A., and Awad, S. E. (2023). Suppression of *Meloiodogyne incognita (Tylenchida : Heteroderidae)* and *Tylenchulus semipenterans (Tylenchida: Tylenchulidae*) using tilapia fish powder and plant growth promoting rhizobacteria *in vivo* and *in vitro*. *European Journal of Plant Pathology*, 165(4), 665-676.

El-Bendary, M. A. (2006). *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. *Journal of Basic Microbiology*, *46*(2), 158-170.

El-Deen, N., El-Sherif, A. G., Mostafa, F. A., and Refaei, A. R. (2007). Efficacy of growth medium (murashigeandskoog) supplemented with certain essential oils on tomato roots suitability to meloidogyne incognita infection under greenhouse conditions. *Journal of Plant Protection and Pathology*, *32*(8), 6809-6819.

Elling, A. A. (2013). Major Emerging Problems with Minor Meloidogyne Species. *Phytopathology®*, *103*(11), 1092-1102.

El-Marzoky, A. M., Elnahal, A. S. M., Jghef, M. M., Abourehab, M. A. S., El-Tarabily, K. A., and Ali, M. A. M. S. (2023). *Purpureocillium lilacinum* strain AUMC 10620 as a biocontrol agent against the citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans* under laboratory and field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 167(6), 1-18.

El-Mohamedy, R. S., Hammam, M. M., Abd-El-Kareem, F., and Abd-Elgawad, M. M. (2016). Biological soil treatment to control *Fusarium solani* and *Tylenchulus semipenetrans* on sour orange seedlings under greenhouse conditions. *Int J ChemTech Res*, *9*(7), 73-85.

El-Nagdi, W., and Abd-El-Khair, H. (2019). Application of *Bacillus* species for controlling root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in eggplant. *Bulletin of the National Research Centre*, *43*(1), 1-10.

Elsherbiny, E. A., Taher, M. A., and Elsebai, M. F. (2019). Activity of *Purpureocillium lilacinum* filtrates on biochemical characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum* and induction of defense responses in common bean. *European Journal of Plant Pathology*, *155*, 39-52.

Elzawahry, A. M., Mahran, A. M. A., and Sallam, M. A. (2014). Management of citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans*) by certain plant species. *Journal of Phytopathology and Pest Management*, 1(3): 46-52.

Engelbrecht, G., Claassens, S., Mienie, C. M. S., and Fourie, H. (2022). Filtrates of mixed **Bacillus** spp inhibit second-stage juvenile motility of root-knot nematodes. *Rhizosphere*, *22*, 100528.

Ennab, H. A. (2016). Effect of humic acid on growth and productivity of Egyptian lime trees (*Citrus aurantifolia Swingle*) under salt stress conditions. *J. Agric. Res. Kafr El-Sheikh Univ*, *42*(4), 494-505.

Essahibi, A., Benhiba, L., Fouad, M. O., Babram, M. A., Ghoulam, C., and Qaddoury, A. (2019). Responsiveness of carob (*Ceratonia siliqua* L.) plants to arbuscular mycorrhizal symbiosis under different phosphate fertilization levels. *Journal of Plant Growth Regulation*, *38*(4), 1243-1254.

Essahibi, A., Benhiba, L., Mohamed Oussouf, F., Babram, M., Ghoulam, C., and Qaddoury, A. (2016). Improved rooting capacity and hardening efficiency of carob (*Ceratonia siliqua* L.) cuttings using arbuscular mycorrhizal fungi. *Archives of Biological Sciences*, 69(2), 291-298.

Ezrari, S., Radouane, N., Tahiri, A., El Housni, Z., Mokrini, F., Özer, G., Lazraq, A., Belabess, Z., Amiri, S., and Lahlali, R. (2022). Dry root rot disease, an emerging threat to citrus industry worldwide under climate change : A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *117*, 101753.

Fadil, M., Fikri-Benbrahim, K., Rachiq, S., Ihssane, B., Lebrazi, S., Chraibi, M., Haloui, T., and Farah, A. (2018). Combined treatment of *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils against *Salmonella typhimurium* : Optimization of antibacterial activity by mixture design methodology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *126*, 211-220.

FAOSTAT. (2021). Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. www.fao.org/faostat/fr/#rankings/countries_by_commodity.

Féboli, A., Laurentiz, A. C., Soares, S. C., Augusto, J. G., Anjos, L. A., Magalhães, L. G., Filardi, R. S., and Laurentiz, R. S. (2016). Ovicidal and larvicidal activity of extracts of Opuntia ficus-indica against gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology*, *226*, 65-68.

Feng, Y., Rui, L., Wang, X., and Wu, X. (2022). Adaptation of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, early in its interaction with two Pinus species that differ in resistance. *Journal of Forestry Research*, *33*(4), 1391-1400.

Feriotto, G., Marchetti, N., Costa, V., Beninati, S., Tagliati, F., and Mischiati, C. (2018). Chemical Composition of Essential Oils from *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus*, and *Rosmarinus officinalis*, and Their Effects on the HIV-1 Tat Protein Function. *Chemistry and biodiversity*, *15*(2), e1700436.

Ferris, H., Venette, R. C., and Scow, K. M. (2004). Soil management to enhance bacterivore and fungivore nematode populations and their nitrogen mineralisation function. *Applied Soil Ecology*, *25*(1), 19-35.

Fisher, J. M., and Raski, D. J. (1967). Feeding of *Xiphinema index* and *X.diversicaudatum. Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, *34*(1), 68.

Flegg, J. I. M., and Hooper, D. J. (1970). Extraction of free-living stages from soil. Technical Bulletin. *Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 5th ed; 2*, 5-22.

Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., and Blaxter, M. (2002). Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular ecology*, *11*(4), 839-850.

Forner-Giner, M. A., Continella, A., and Grosser, J. W. (2020). Citrus Rootstock Breeding and Selection. *The citrus genome*, 49-74.

Fouad, M. O., Essahibi, A., Benhiba, L., and Qaddoury, A. (2014). Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of olive plants against oxidative stress induced by drought. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12(3), 763-771

Fra, C.-, FRA, G.-, and FRA, M. des affaires étrangères (France). (2002). *Mémento de l'agronome*. CIRAD. https://agritrop.cirad.fr/511326/.

Gamalero, E., and Glick, B. R. (2020). The use of plant growth-promoting bacteria to prevent nematode damage to plants. *Biology*, 9(11), 381.

Garcia, N., Grenier, E., Buisson, A., and Folcher, L. (2022). Diversity of plant parasitic nematodes characterized from fields of the French national monitoring programme for the Columbia root-knot nematode. *Plos one*, *17*(3), e0265070.

Gerdemann, J. W., and Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological society*, *46*(2), 235-244.

G**haderi, R., and Hosseinvand, M. (2022).** Non-chemical Management of the Citrus Nematode, *Tylenchulus semipenetrans (Nematoda : Tylenchulidae*). *Sustainable Management of Nematodes in Agriculture, Vol. 1 : Organic Management* (p. 217-245). Cham: Springer International Publishing.

Gharu, A. D., Rathore, I., and Tarafdar, J. (2023). Assessing Fungal Inoculants for Native P Mobilization. *Biological Forum – An International Journal*, 15(6), 93-104.

Ghasemian, A., Al-Marzoqi, A.-H., Mostafavi, S. K. S., Alghanimi, Y. K., and Teimouri, M. (2020). Chemical Composition and Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Foeniculum vulgare* Mill Essential Oils. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, *51*(1), 260-266.

Giebel, J. (1974). Biochemical mechanisms of plant resistance to nematodes : A review. *Journal of Nematology*, *6*(4), 175.

Gill, S. S., and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, *48*(12), 909-930.

Global Citrus Outlook. (2019). *Citrus production and export in perspective of global fruit trends*. https://worldcitrusorganisation.org/wp-content/uploads/2020/01/Citrus-Market-Trends-2019.pdf

Gómez-Martínez, M., Ascacio-Valdés, J. A., Flores-Gallegos, A. C., González-Domínguez, J., Gómez-Martínez, S., Aguilar, C. N., Morlett-Chávez, J. A., and Rodríguez-Herrera, R. (2020). Location and tissue effects on phytochemical composition and *in vitro* antioxidant activity of Moringa oleifera. *Industrial crops and products*, *151*, 112439.

Gonzatto, M. P., Santos, J. S., Gonzatto, M. P., and Santos, J. S. (2023). Introductory Chapter : World Citrus Production and Research. In *Citrus Research—Horticultural and Human Health Aspects*.

Goyal, L., Kaushal, S., Dhillon, N. K., and Heena. (2021). Nematicidal potential of Citrus reticulata peel essential oil, isolated major compound and its derivatives against

Meloidogyne incognita. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *54*(9-10), 449-467.

Greco, N., and D'Addabbo, T. (1990). Efficient procedure for extracting *Tylenchulus semipenetrans* from citrus roots. *Journal of nematology*, *22*(4), 590.

Guo, X., Endler, A., Poll, C., Marhan, S., and Ruess, L. (2021). Independent effects of warming and altered precipitation pattern on nematode community structure in an arable field. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *316(9)*, 107467.

Gupta, A., Sharma, S., and Naik, S. N. (2011). Biopesticidal value of selected essential oils against pathogenic fungus, termites, and nematodes. *International biodeterioration and biodegradation*, *65*(5), 703-707.

Hadria, R., Elmansouri, L., Benabdelouahab, T., Ouatiki, H., Lebrini, Y., Htitiou, A., and Khellouk, R. (2019). Recours aux satellites pour appuyer le management de l'eau d'irrigation : Estimation des besoins en eau des agrumes par télédétection dans la Plaine de Triffa-Berkane (Maroc). *African Journal on Land Policy and Geospatial Sciences*, *2*(2), 135-148.

Halder, S., Khan, R., Perween, T., Hasan, M., Ghosh, S., and Khan, A. (2019). Role of pollination in fruit crops : A review. *The Pharma Innovation Journal*, 8(5), 695-702.

Hammam, M., Abdel Gawad, M., Ruan, W., and El-bahrawy, A. (2021). Management of pests and pathogens affecting citrus yield in Egypt with special emphasis on nematodes. *Egyptian Journal of Agronematology*, *20*(2), 64-84.

Hammam, M. M. A., Wafaa, M., and Abd-Elgawad, M. (2016). Biological and chemical control of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans* (Cobb, 1913) on mandarin in Egypt. *Egyptian journal of pest control*, *26*, 345-349.

Hanawi, M. J. (2016). Fungal and bacterial bio-control agents in controlling citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans* Cobb in greenhouse and field. *European Academic Research*, 4(9), 7824-7841.

Harbouze, R., Pellissier, J.-P., Rolland, J.-P., and Khechimi, W. (2019). Rapport de synthèse sur l'agriculture au Maroc. Thèse de doctorat. CIHEAM-IAMM.

Hernández-Carlos, B., and Gamboa-Angulo, M. (2019). Insecticidal and nematicidal contributions of Mexican flora in the search for safer biopesticides. *Molecules*, *24*(5), 897.

Hewitt, W. B., Raski, D. J., and Goheen, A. C. (1958). Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology*, *48*(11), 586-595.

Hikal, W. M., Baeshen, R. S., and Said-Al Ahl, H. A. (2017). Botanical insecticide as simple extractives for pest control. *Cogent Biology*, *3*(1), 1404274.

Hoffmann, K., Telle, S., Walther, G., Eckart, M., Kirchmair, M., Prillinger, H., Prazenica, A., Newcombe, G., Dölz, F., and Papp, T. (2009). Diversity, genotypic identification, ultrastructural and phylogenetic characterization of zygomycetes from different ecological habitats and climatic regions : Limitations and utility of nuclear ribosomal DNA barcode markers. *Current advances in molecular mycology. Nova Science Publishers, Inc, New York*, 263-312.

Holterman, M., van der Wurff, A., van den Elsen, S., van Megen, H., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., and Helder, J. (2006). Phylum-wide analysis of SSU

rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown Clades. *Molecular Biology and Evolution*, *23*(9), 1792-1800.

Hori, Y., Takahashi, R., Yoshinami, Y., and Murata, A. (1997). Electrochemical Reduction of CO at a Copper Electrode. *The Journal of Physical Chemistry B*, *101*(36), 7075-7081.

Hugot, J.-P., Baujard, P., and Morand, S. (2001). Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study : An overview. *Nematology*, *3*(3), 199-208.

Hung, R., and Lee Rutgers, S. (2016). Chapter 17—Applications of *Aspergillus* in Plant Growth Promotion. In V. K. Gupta (Éd.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 23-227.

Hunt, D. J., and Handoo, Z. A. (2009). Taxonomy, identification and principal species. In *Root-knot nematodes*. CABI Wallingford UK, 55-97.

Hussey, R. S., and Barker, K. R. (1973). Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Repor*ter, 57(11), 1025-1028.

Ibrahim, I. K. A., Mokbel, A. A., and Handoo, Z. A. (2010). Current status of phytoparasitic nematodes and their host plants in Egypt. *Nematropica*, 40(2), 239-262.

Ibrahim, S. K., Traboulsi, A. F., and El-Haj, S. (2006). Effect of essential oils and plant extracts on hatching, migration and mortality of *Meloidogyne incognita*. *Phytopathologia Mediterranea*, *45*(3), 238-246.

Ingham, R. E., Trofymow, J. A., Ingham, E. R., and Coleman, D. C. (1985). Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers : Effects on nutrient cycling and plant growth. *Ecological monographs*, *55*(1), 119-140.

Iraqi, H.A., 2001. Caractérisation microbiologique et physicochimique des feuilles mortes de *Populus euramericana* en décomposition dans l'hydrosystème d'Ain El Rhars du moyen atlas marocain. Thèse de doctorat. Université Sidi mohamed ben Abdellalh, faculté des sciences Dhar El Mahraz.189p.

Iglesias, D. J., Cercós, M., Colmenero-Flores, J. M., Naranjo, M. A., Ríos, G., Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., Lliso, I., Morillon, R., and Tadeo, F. R. (2007). Physiology of citrus fruiting. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(4), 333-362.

Iqbal, M. A., Mukhtar, T., and Ahmad, R. (2005). Potentiality of some plants to control citrus nematode. *Pak. J Phytopathol*, *17*(1), 36-42.

Iqbal, M. A., Mukhtar, T., Ahmad, R., and Khan, H. U. (2005). Relative susceptibility/resistance of citrus rootstocks to citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans*). *Pakistan Journal of Nematology (Pakistan)*, 23(2), 311-315.

Jabbar, W. J., and Abedulridah, E. M. (2023). Research paper (survey : nematodes) survey of citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans* causing citrus slow decline in Karbala Province of Iraq. *Arab journal of plant protection*. 41(1), 8-11

J**acquemond, C., Curk, F., and Heuzet, M. (2013).** *Les clémentiniers et autres petits agrumes*. Editions Quae, 2-20.

Jaiman, M., Baheti, B. L., and Deshwal, B. (2022). Citrus Nematode (*Tylenchulus semipenetrans*) Distribution, Life Cycle, Symptoms and Options for Management. *Vigyan Varta*, *3*(12), 112-114.

Javed, N., Javed, M., Ilyas, M. B., Khan, M. M., and Inam-Ul-Haq, M. (2008). Reaction of various citrus root stocks (germplasm) against citrus root nematode (*Tylenchulus semipenetrans* Cobb.). *Pak. J. Bot*, *40*(6), 2693-2696.

Jedidi, I., Soldevilla, C., Lahouar, A., Marín, P., González-Jaén, M. T., and Said, S. (2018). Mycoflora isolation and molecular characterization of A*spergillus* and *Fusarium* species in Tunisian cereals. *Saudi journal of biological sciences*, *25*(5), 868-874.

Jha, A., and Posnette, A. F. (1961). Transmission of arabis mosaic virus by the nematode *Xiphinema diversicaudatum* (Micol.). *Virology*, *13*(1), 119-123.

Jiang, X., Xiang, M., and Liu, X. (2017). Nematode-Trapping Fungi. *Microbiology Spectrum*, *5*(1), 1-5.

Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M. L., and Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *14*(9), 946-961.

Jung, S. C., Martinez-Medina, A., Lopez-Raez, J. A., and Pozo, M. J. (2012). Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of chemical ecology*, *38*, 651-664.

Jurado, V., Hernández Mariné, M., and Sáiz-Jiménez, C. (2017). Biodiversity and cleaning of phototrophic biofilms in Cueva del Tesoro, Rincón de la Victoria, Málaga, Spain.

Kai, S., Matsuo, Y., Nakagawa, S., Kryukov, K., Matsukawa, S., Tanaka, H., Iwai, T., Imanishi, T., and Hirota, K. (2019). Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION^{TM} nanopore sequencer. *FEBS Open Bio*, *9*(3), 548-557.

Kallel, S., Louhichi, A., and Mohamed, M. B. (2006). Résistance de *Citrus aurantium* induite par le *Poncirus trifoliata* vis-à-vis de *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. *Nematology*, *8*(5), 671-679.

Kamal, N., Parshad, J., Saharan, B. S., Kayasth, M., Mudgal, V., Duhan, J. S., Mandal, B. S., and Sadh, P. K. (2023). Ecosystem Protection through Myco-Remediation of Chromium and Arsenic. *Journal of Xenobiotics*, 13(1), 159-171.

Kaplan, D. T. (1981). Characterization of Citrus Rootstock Responses to *Tylenchulus semipenetrans* (Cobb). *Journal of Nematology*, *13*(4), 492-498.

Kaur, M., Chahal, K., Kumar, A., and Kaur, R. (2018). Nematicidal activity of bay leaf (*Laurus nobilis* L.) essential oil and its components against *Meloidogyne incognita*. *J. Entomol. Zool. Stud*, 6(2), 1057-1064.

Kazeem, M. O., Uthman-Saheed, L., and Oke, M. A. (2021). Impact of pretreatment severity on fungal cellulase production on sugarcane bagasse substrate. *Journal of Taibah University for Science*, *15*(1), 367-375.

Kepenekci, I., Erdoğuş, D., and Erdoğan, P. (2016). Effects of some plant extracts on root-knot nematodes in vitro and *in vivo* conditions. *Turkish Journal of Entomology*, *40*(1), 1-17.

Keshari, N., Mallikarjun, G., Keshari, N., and Mallikarjun, G. (2022). Plant Parasitic Nematodes : A Major Constraint in Fruit Production. *Nematodes—Recent Advances, Management and New Perspectives*, 1-33

Khalil, M., eltanany, Mahmoud, and El-shahaat, M. (2018). Efficacy of three Bio-pesticide products and oxamyl against citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans*) and on productivity of Washington navel orange trees. *Egyptian Journal of Horticulture*, *45(2)*, 275-287.

Khalil, M. S., and Alqadasi, A. A. A. (2019). Potential of non-fumigant nematicides at different formulations against southern root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on Tomato Plants. *International Journal of Phytopathology*, *8*(1), 23-28.

Khan, A., Bani Mfarrej, M. F., Tariq, M., Asif, M., Nadeem, H., Siddiqui, M. A., Hashem, M., Alamri, S., and Ahmad, F. (2022). Supplementing *Pochonia chlamydosporia* with botanicals for management of *Meloidogyne incognita* infesting chickpea. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil and Plant Science*, *72*(1), 164-175.

Khatoon, H., Chavan, D., Anokhe, A., and Kalia, V. (2022). Catalase Test : A Biochemical Protocol for Bacterial Identification. *AgriCos e-Newsletter*, 3(18), 53-55.

Khfif, K., Mokrini, F., and Sbaghi, M. (2022). Population monitoring of males steriles of Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata* Wiedemann, 1824) in citrus orchards of the Moulouya region. *Afr. Mediterr. Agric. J*, *135*, 123-135.

Kim, D. S., Kim, S., Stanghellini, M., Meyer-Jertberg, M., and Fennimore, S. (2022). Evaluation of a Steam Application by a Mobile Applicator for Soil Disinfestation in Strawberry Nurseries. *HortScience*, 57(6), 726-730.

Kim, E., Seo, Y., Kim, Y. S., Park, Y., and Kim, Y. H. (2017). Effects of soil textures on infectivity of root-knot nematodes on carrot. *The plant pathology journal*, *33*(1), 66.

Klein, M. L., Chastain, T. G., Garbacik, C. J., Qian, Y. P. L., and Mc Donnell, R. J. (2020). Acute toxicity of essential oils to the pest slug *Deroceras reticulatum* in laboratory and greenhouse bioassays. *Journal of Pest Science*, *93*, 415-425.

Klusmann, C., Cesarz, S., Ciobanu, M., Ferlian, O., Jochum, M., Schädler, M., Scheu, S., Sünnemann, M., Wall, D. H., and Eisenhauer, N. (2022). Climate-change effects on the sex ratio of free-living soil nematodes–perspective and prospect . *Soil Organisms*, *94*(1), 15-28.

Korthals, G. W., Bongers, T., Kammenga, J. E., Alexiev, A. D., and Lexmond, T. M. (1996). Long-term effects of copper and pH on the nematode community in an agroecosystem. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, *15*(6), 979-985.

Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N., and Shaaya, E. (2002). Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants : Possible mode of action against insect pests. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, *58*(11), 1101-1106.

Krebs, J. C. (1985). Ecología : Estudio de la distribución y abundancia. 2da. Edición. Harla. Harper y Rw Latinoamericano) Editores. México, 3, 25-42.

Krueger, R., and McSorley, R. (2008). Nematode management in organic agriculture. *University of Florida: IFAS Extension*, 1-9.

Kumar, K. K., and Arthurs, S. (2021). Recent advances in the biological control of citrus nematodes : A review. *Biological Control*, *157*, 104593.

Kumar, K. K., and Das, A. K. (2019). Diversity and community analysis of plant parasitic nematodes associated with citrus at citrus research station, Tinsukia, Assam. *J. Entomol. Zool. Stud*, *7*, 187-189.

Kumar, V., Khan, M. R., and Walia, R. K. (2020). Crop loss estimations due to plant-parasitic nematodes in major crops in India. *National Academy Science Letters*, *43*, 409-412.

Laasli, S.-E., Mokrini, F., Lahlali, R., Wuletaw, T., Paulitz, T., and Dababat, A. A. (2022). Biodiversity of nematode communities associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) in southern Morocco and their contribution as soil health bioindicators. *Diversity*, *14*(3), 194.

Labiadh, M., Aidi, R., M'hamdi, B., Rhouma, A., Flahaut, S., and Kallel, S. (2019). Occurrence and functional diversity of bacteria in rhizosphere of citrus trees infested by *Tylenchulus semipenetrans* in a citrus-growing area of Tunisia. *European Journal of Plant Pathology*, *155*(2), 475-488.

Labiadh, M., Mhamdi, B., Loulou, A., and Sadreddine, K. (2023). Impact of rhizobacteria community of citrus root on *Tylenchulus semipenetrans* and on Citrus plant growth. *Biocontrol Science and Technology*, *33*(3), 241-257.

Lachapelle, J. (2004). Microscopie, méthodes d'examen, colorations. *Revue du Cercle de Mycologie de Bruxelles*, *4*, 35-71.

LaMondia, J., and Timper, P. (2016). Interactions of microfungi and plant-parasitic nematodes. *Biology of Microfungi*, 573-614.

Laquale, S., Avato, P., Argentieri, M. P., Bellardi, M. G., and D'Addabbo, T. (2018). Nematotoxic activity of essential oils from Monarda species. *Journal of pest science*, *91*, 1115-1125.

Lebrazi, S., Niehaus, K., Bednarz, H., Fadil, M., Chraibi, M., and Fikri-Benbrahim, K. (2020). Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization by rhizobacterial strains isolated from Acacia cyanophylla root nodules and their effects on its plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *18*(71), 1-12.

Lee, D. L. (2002). *The biology of nematodes*. CRC Press, 1-62.

Leong, S. S., Leong, S. C. T., Pau, C. G., and Beattie, G. A. C. (2021). *In vitro* bioassay of *Purpureocillium lilacinum* and *Bacillus thuringiensis* for control of *Meloidogyne incognita* on black pepper (*Piper nigrum* L.) in Sarawak, Malaysia, Northern Borneo. *Journal of the Entomological Research Society*, *23*(1), 41-59.

Li, J., Zou, C., Xu, J., Ji, X., Niu, X., Yang, J., Huang, X., and Zhang, K.-Q. (2015). Molecular Mechanisms of Nematode-Nematophagous Microbe Interactions : Basis for Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, *53*(1), 67-95.

Li, T., Wang, H., Xia, X., Cao, S., Yao, J., and Zhang, L. (2018). Inhibitory effects of components from root exudates of Welsh onion against root knot nematodes. *PLoS ONE*, 13(7), e0201471.

Liu, H., Huang, W., Gao, J., Dai, K., Zheng, G., Liu, C., Shen, C., Yan, X., Guo, J., and Guo, Z. (2016). Piezoresistive behavior of porous carbon nanotube-thermoplastic

polyurethane conductive nanocomposites with ultrahigh compressibility. *Applied Physics Letters*, *108*(1), 011904.

Liu, X. C., Liu, Q., Zhou, L., and Liu, Z. L. (2014). Evaluation of larvicidal activity of the essential oil of *Allium macrostemon* Bunge and its selected major constituent compounds against Aedes albopictus (Diptera : Culicidae). *Parasites and Vectors*, *7*(1), 1-5.

Liu, X., Xiang, M., and Che, Y. (2009). The living strategy of nematophagous fungi. *Mycoscience*, *50*(1), 20-25.

Liu, Y., Heying, E., and Tanumihardjo, S. A. (2012). History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive reviews in Food Science and Food safety*, *11*(6), 530-545.

Loussert, R. (1985). Les agrumes, vol. 1. *Lavoisier*, *Paris*, *113*.

Luo, T., Hou, S., Yang, L., Qi, G., and Zhao, X. (2018). Nematodes avoid and are killed by Bacillus mycoides-produced styrene. *Journal of invertebrate pathology*, *159*, 129-136.

Luo, X.-W., Lin, Y., Lu, Y.-J., Zhou, X.-F., and Liu, Y.-H. (2019). Peptides and polyketides isolated from the marine sponge-derived fungus Aspergillus terreus SCSIO 41008. *Chinese Journal of Natural Medicines*, *17*(2), 149-154.

Lv, X., Zhao, S., Ning, Z., Zeng, H., Shu, Y., Tao, O., Xiao, C., Lu, C., and Liu, Y. (2015). Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. *Chemistry Central Journal*, *9*(68),1-14.

Maatala, N., Fadlaoui, A., and Lebailly, P. (2018). Quels impacts du partenariat public-privé sur les exploitations agricoles et la valorisation de l'eau d'irrigationtion''Cas du projet El Guerdane au Maroc''. *Colloque"Politiques agricoles et alimentaires: Trajectoires et réformes"*.

Macaron, J. (1972). Contribution à l'étude du nématode phytophage *Tylenchulus semipenetrans* Cobb 1913-Nematoda tylenchida.

Mai, W. F., and Mullin, P. G. (1996). Plant-parasitic nematodes : A pictorial key to genera (5th ed). Comstock Pub. Associates, Cornell University Press, 44-276.

Mani, A., Murthy, I. R., Rao, P. K., and Prasad, V. D. (1989). Growth of *Paecilomyces lilacinus* on natural substrates and its efficacy against citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*. *Journal of Biological control*, *3*(1), 59-61.

Marcon, E. (2015). Mesures de la Biodiversité. Thèse de doctorat. AgroParisTech, 284p.

Martin, R. J., and Robertson, A. P. (2010). Control of nematode parasites with agents acting on neuro-musculature systems : Lessons for neuropeptide ligand discovery. *Neuropeptide Systems as Targets for Parasite and Pest Control*, 138-154.

Martin, R. R., Eastwell, K. C., Wagner, A., Lamprecht, S., and Tzanetakis, I. E. (2005). Survey for Viruses of Grapevine in Oregon and Washington. *Plant Disease*, *89*(7), 763-766.

Mateille, T. (1992). Contribution à l'étude des relations hôte-parasite entre le bananier Musa acuminata (groupe 'AAA') et trois nématodes phytophages : *Radopholus similis, Helicotylenchus multicinctus* et *Hoplolaimus pararobustus* (*Tylenchida*). *ORSTOM*, 251p

Mateille, T. (1994). Réactions biochimiques provoquées par trois nématodes phytoparasites dans les racines de *Musa acuminata* (groupe AAA) variétés Poyo et Gros Michel. *Fundamental and Applied Nematology*, *17*(3), 283-290.

Matheyambath, A. C., Padmanabhan, P., and Paliyath, G. (2016). Citrus Fruits. In B. Caballero, P. M. Finglas, and F. Toldrá (Éds.), *Encyclopedia of Food and Health* Academic Press, 136-140.

Mc Donnell, R., Yoo, J., Patel, K., Rios, L., Hollingsworth, R., Millar, J., and Paine, T. (2016). Can essential oils be used as novel drench treatments for the eggs and juveniles of the pest snail *Cornu aspersum* in potted plants? *Journal of pest science*, *89*, 549-555.

McGuire, J. M. (1973). Retention of tobacco ringspot virus by *Xiphinema americanum*. *Phytopathology*, *63*(2), 324-326.

Meena, O. P., Maurya, B. R., and Meena, V. S. (2013). Influence of K-solubilizing bacteria on release of potassium from waste mica. *Agric Sust Dev*, *1*, 53-56.

Mengistu, G., Hoste, H., Karonen, M., Salminen, J.-P., Hendriks, W. H., and Pellikaan, W. F. (2017). The *in vitro* anthelmintic properties of browse plant species against *Haemonchus contortus* is determined by the polyphenol content and composition. *Veterinary Parasitology*, *237*, 110-116.

Merryweather, J., and Moyersoen, B. (1997). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 32, 374.

Meyer, S. L., Lakshman, D. K., Zasada, I. A., Vinyard, B. T., and Chitwood, D. J. (2008). Dose–response effects of clove oil from *Syzygium aromaticum* on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, *64*(3), 223-229.

Michel-Dewez, N., and Ek, C. (1982). Méthode rapide de caractérisation des dolomies et calcaires magnésiens : La gaz-volumétrie. *Bulletin de la Société Géographique de Liège*, *18*, 41-48

Migunova, V. D., and Sasanelli, N. (2021). Bacteria as Biocontrol Tool against Phytoparasitic Nematodes. *Plants*, *10*(2), 389.

Milne, D. L., and De Villiers, E. A. (1977). Soil application of systemic pesticides for control of thrips and nematodes on citrus. *Citrus and sub-tropical fruit journal*.

Ministère de L'agriculture. (2018). Le plan maroc vert, bilan et impacts 2008-2018. www.agriculture.gov.ma/fr/publications/plan-maroc-vert-bilan-et-impacts.

Ministère de l'Agriculture. (2019). Division des Statistiques, Maroc, Available online : www.agriculture.gov.ma.

Miralrio, A., and Espinoza Vázquez, A. (2020). Plant extracts as green corrosion inhibitors for different metal surfaces and corrosive media : A review. *Processes*, *8*(8), 942.

Mirzaei, H., Knijnenburg, T. A., Kim, B., Robinson, M., Picotti, P., Carter, G. W., Li, S., Dilworth, D. J., Eng, J. K., and Aitchison, J. D. (2013). Systematic measurement of transcription factor-DNA interactions by targeted mass spectrometry identifies candidate gene regulatory proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(9), 3645-3650.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, *7*(9), 405-410.

Mohammed, E., Belmehdi, I., and Zemzami, M. (2015). Citrus rootstocks in Morocco : Present situation and future prospects. *Acta Horticulturae, No.1065*, 313-317.

Mokrini, F. (2019). Les nématodes phytoparasites associés à la culture de la vigne au Maroc. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires, 7*, 95-98.

Mokrini, F., Andaloussi, F. A., Waeyenberge, L., Viaene, N., and Moens, M. (2014). First report of the dagger nematode *Xiphinema diversicaudatum* in citrus orchards in Morocco. *Plant disease*, *98*(4), 575-575.

Mokrini, F., Janati, S., Andaloussi, F. A., Essarioui, A., Houari, A., and Sbaghi, M. (2018a). Importance et répartition des principaux nématodes phytoparasites des agrumes au Maroc. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, *6*(4), 558-564.

Mokrini, F., Janati, S., Andaloussi, F., Essarioui, A., Houari, A., and Sbaghi, M. (2018b). Importance et répartition des principaux nématodes phytoparasites des agrumes au Maroc. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 6(4), 558-564

Mokrini, F., Laasli, S.-E., Iraqui, D., Wifaya, A., Mimouni, A., Erginbas-Orakci, G., Imren, M., and Dababat, A. A. (2019). Distribution and occurrence of plant-parasitic nematodes associated with raspberry (*Rubus idaeus*) in Souss-Massa region of Morocco : Relationship with soil physico-chemical factors. *Russian Journal of Nematology*, *27*(2), 107-121.

Mokrini, F., Laasli, S.-E., Karra, Y., El Aissami, A., and Dababat, A. A. (2019). Diversity and incidence of plant-parasitic nematodes associated with saffron (*Crocus sativus* L.) in Morocco and their relationship with soil physicochemical properties. *Nematology*, *22*(1), 87-102.

Montasser, S. A., El-Wahab, A. E., Abd-Elgawad, M., Abd-El-Khair, H., Faika, F. H. K., and Hammam, M. M. A. (2012). Effects of some fungi and bacteria as bio-control agents against citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans* cobb. *Journal of Applied Sciences Research, 8(11)*, 5436-5444.

Montasser, S. A., El-wahab, A. E., Abd-Elgawad, M. M., Abd-El-Khair, H., Koura, F. H., and Hammam, M. M. (2012). Role of some plant extracts and organic manure in controlling *Tylenchulus semipenetrans* Cobb *in vitro* and *in vivo* in citrus. *Journal of Applied Sciences Research*, *8*(11), 5415-5424.

Moosavi, M. R. (2022). Potential of soil amendment with organic matters in controlling phytonematodes. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 315-344.

Morais-Costa, F., Soares, A. C. M., Bastos, G. A., Nunes, Y. R. F., Geraseev, L. C., Braga, F. C., dos Santos Lima, W., and Duarte, E. R. (2015). Plants of the Cerrado naturally selected by grazing sheep may have potential for inhibiting development of *Haemonchus contortus* larva. *Tropical Animal Health and Production*, *47*(7), 1321-1328.

Muhammad Azhar, I. (2003). *E*cology, biology and integrated control of citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans* cobb.) the cause of slow decline in the punjab, pakistan. Thèse de doctorat. University of Agriculture. Faisalabad Pakistan.

Mwamula, A. O., Kabir, Md. F., and Lee, D. (2022). A review of the potency of plant extracts and compounds from key families as an alternative to synthetic nematicides : History, Efficacy, and Current Developments. *The Plant Pathology Journal*, *38*(2), 53-77.

Nagachandrabose, S., Jayaraman, J., and Somasundaram, P. (2022). Application of liquid bio-inoculants through a drip irrigation system to manage slow decline disease caused by *Tylenchulus semipenetrans* in acid lime trees. *Phytoparasitica*, *50*(1), 243-253.

Nasiri, M., Azizi, K., Hamzehzarghani, H., and Ghaderi, R. (2014). Studies on the nematicidal activity of stinging nettle (*Urtica dioica*) on plant parasitic nematodes. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *47*(5), 591-599.

Nehela, Y., and Killiny, N. (2020). The unknown soldier in citrus plants : Polyamines-based defensive mechanisms against biotic and abiotic stresses and their relationship with other stress-associated metabolites. *Plant Signaling and Behavior*, *15*(6), 1761080.

Neipp, P. W., and Becker, J. O. (1999). Evaluation of biocontrol activity of rhizobacteria from *Beta vulgaris* against *Heterodera schachtii*. *Journal of Nematology*, *31*(1), 54-61.

Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., and Thonart, P. (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, *15*(2), 327-337.

Nile, A. S., Nile, S. H., Keum, Y. S., Kim, D. H., Venkidasamy, B., and Ramalingam, S. (2018). Nematicidal potential and specific enzyme activity enhancement potential of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) aerial parts. *Environmental Science and Pollution Research*, *25(3)*, 4204-4213.

Nisa, R. U., Tantray, A. Y., Kouser, N., Allie, K. A., Wani, S. M., Alamri, S. A., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., and Shah, A. A. (2021a). Influence of ecological and edaphic factors on biodiversity of soil nematodes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(5), 3049-3059.

Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D. L., Nijs, L. D., Hockland, S., and Maafi, Z. T. (2011). Current nematode threats to world agriculture. *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions*, 21-43.

Norton, D. C. (1989). Abiotic soil factors and plant-parasitic nematode communities. *Journal of nematology*, *21*(3), 299.

Nouman, W., Anwar, F., Gull, T., Newton, A., Rosa, E., and Domínguez-Perles, R. (2016). Profiling of polyphenolics, nutrients and antioxidant potential of germplasm's leaves from seven cultivars of *Moringa oleifera* Lam. *Industrial Crops and Products*, *83*, 166-176.

Ntalli, N. G., Ferrari, F., Giannakou, I., and Menkissoglu-Spiroudi, U. (2011). Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. *Pest management science*, *67*(3), 341-351.

Ntalli, N. G., Ozalexandridou, E. X., Kasiotis, K. M., Samara, M., and Golfinopoulos, S. K. (2020). Nematicidal activity and phytochemistry of Greek *Lamiaceae* species. *Agronomy*, *10*(8), 1119.

O'Bannon, J. H., Inserra, R. N., Nemec, S., and Vovlas, N. (1979). The Influence of *Glomus mosseae* on *Tylenchulus semipenetrans*-Infected and Uninfected *Citrus limon* Seedlings. *Journal of Nematology*, *11*(3), 247-250.

O'Bannon, J. H., Radewald, J. D., and Tomerlin, A. T. (1972). Population fluctuation of three parasitic nematodes in Florida citrus. *Journal of Nematology*, *4*(3), 194-199.

O'bannon, J. H., Reynolds, H. W., and Leathers, C. R. (1966). Effects of temperature on penetration, development, and reproduction of *Tylenchulus semipenetrans*. *Nematologica*, *12*, 483-487.

O'Bannon, J. H., and Tomerlin, A. (1973). Citrus tree decline caused by *Pratylenchus coffeae*. *Journal of Nematology*, *5*(4), 311.

Oka, Y., Koltai, H., Bar-Eyal, M., Mor, M., Sharon, E., Chet, I., and Spiegel, Y. (2000). New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. *Pest Management Science*, *56*(11), 983-988.

Omayio, D., Mzungu, E., and Kakamega, K. (2019). Modification of shannon-wiener diversity index towards quantitative estimation of environmental wellness and biodiversity levels under a non-comparative Scenario. *Journal of Environment and Earth Science*, *9*(9), 46-57.

Oostenbrink, M. (1966). Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Proceedings of the 8th International Symposium of nematology, Antibes, France*, 8-14.

Özcan, M. M. (2020). *Moringa* spp : Composition and bioactive properties. *South African Journal of Botany*, *129*, 25-31.

Özdemir, F. G. G., and Arici, Ş. E. (2023). Control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* Jarvis and Shoemaker (*Ascomycota : Hypocreales*) and *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949 (*Nemata: Meloidogynidae*) with *Aspergillus niger* Tiegh. (*Ascomycota: Eurotiales*) culture filtrate on tomato. *Turkish Journal of Entomology*, *47*(2), 123-132.

Pandey, A., Palni, L. M. S., and Bisht, D. (2001). Dominant fungi in the rhizosphere of established tea bushes and their interaction with the dominant bacteria under in situ conditions. *Microbiological Research*, *156*(4), 377-382.

Pastor Audi, J., Verdejo Lucas, S., Sorribas, X., and Scals, D. de. (2005). Nematodos fitoparásitos en cítricos : Problemática y control. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, *172*, 73-79.

Pa**rejo, I., Jauregui, O., Sánchez-Rabaneda, F., Viladomat, F., Bastida, J., and Codina, C. (2004).** Separation and Characterization of Phenolic Compounds in Fennel (*Foeniculum vulgare*) Using Liquid Chromatography−Negative Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(12), 3679-3687.

Pérez, Y., and Schenck, N. C. (1990). A unique code for each species of VA mycorrhizal fungi. *Mycologia*, *82*(2), 256-260.

Perry, R. N., and Moens, M. (2013). Plant nematology. Cabi, 1-49.

P**estovsky, Y. S., and Martínez-Antonio, A. (2017).** The Use of Nanoparticles and Nanoformulations in Agriculture. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *17*(12), 8699-8730.

Philis, I. (1989). Yield loss assessment caused by the citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans* on Valencia oranges Cyprus. *Nematologia Mediterranea*, 17(1),1-10.

Pielou, E. C. (1969). An introduction to mathematical ecology. *New York, USA, Wiley-Inter-science, 286.*

Popova, E. A., Kreyer, V. G., Komarevtsev, S. K., Shabunin, S. V., and Osmolovskiy, A. A. (2021). Properties of extracellular proteinase of the micromycete *Aspergillus ustus* 1 and its high activity during fibrillary-proteins hydrolysis. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *57*, 200-205.

Poveda, J., Abril-Urias, P., and Escobar, C. (2020). Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance : *Trichoderma*, Mycorrhizal and Endophytic Fungi. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 992.

Powell, N. T. (1971). Interactions between nematodes and fungi in disease complexes. *Annual review of phytopathology*, *9*(1), 253-274.

Praloran, J. C. (1968). Les besoins en chaleur et en lumière des agrumes. *Fruits*, (2), 107-117.

Pretorius, M. C., Huisman, L., Le Roux, H. F., Van den Berg, E., and Tiedt, L. R. (2002). Detection of a *Hemicycliophora* species on citrus in the Gamtoos River Valley. *Afr Plant Protect*, *8*, 77.

P**retorius, M. C., and Le Roux, H. F. (2017).** Nematode pests of Citrus. In H. Fourie, V. W. Spaull, R. K. Jones, M. S. Daneel, and D. De Waele (Éds.), *Nematology in South Africa : A View from the 21st Century*, 311-324.

Puigventós, L., Navarro, M., Alechaga, É. Núñez, O., Saurina, J., Hernández-Cassou, S., and Puignou, L. (2015). Determination of polyphenolic profiles by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the authentication of fruit extracts. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *407*(2), 597-608.

Pulavarty, A., Egan, A., Karpinska, A., Horgan, K., and Kakouli-Duarte, T. (2021). Plant parasitic nematodes : a review on their behaviour, host interaction, management approaches and their occurrence in two sites in the republic of Ireland. *Plants*, *10*(11), 2352.

Ragavendran, C., Srinivasan, R., Kim, M., and Natarajan, D. (2018). *Aspergillus terreus* (*Trichocomaceae*): A natural, eco-friendly mycoinsecticide for control of malaria, filariasis, dengue vectors and its toxicity assessment against an aquatic model organism *Artemia nauplii*. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1355.

Rashidifard, M., Fourie, H., Ashrafi, S., Engelbrecht, G., Elhady, A., Daneel, M., and Claassens, S. (2022). Suppressive effect of soil microbiomes associated with tropical fruit trees on *Meloidogyne enterolobii*. *Microorganisms*, *10*(5), 894.

Reddy, P. P., and Singh, D. B. (1979). Nematode problems of citrus in India. *PANS*, *25*(4), 409-419.

Reynolds, H. W., and O'bannon, J. H. (1963). Decline of grapefruit trees in relation to citrus nematode populations and tree recovery after chemical treatment. *Phytopathology*, *53*(9), 1011-1015.

Riedel, R. M. (1988). Interactions of plant-parasitic nematodes with soil-borne plant pathogens. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *24*(1), 281-292.

Rivera, M. J., Martini, X., Khrimian, A., and Stelinski, L. (2017). A weevil sex pheromone serves as an attractant for its entomopathogenic nematode predators. *Chemoecology*, *27*, 199-206.

Rehecho, S., Hidalgo, O., de Cirano, M. G.-I., Navarro, I., Astiasarán, I., Ansorena, D., Cavero, R. Y., and Calvo, M. I. (2011). Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L. *LWT-Food Science and Technology*, *44*(4), 875-882.

Robbins, R. T., Ye, W., and Pedram, M. (2009). *Longidorus ferrisi* n. Sp. from California citrus. *Journal of Nematology*, *41*(2), 104.

Roberto, S. R., Novello, V., and Fazio, G. (2022). New rootstocks for fruit crops : Breeding programs, current use, future potential, challenges and alternative strategies. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 1-3.

Rodriguez-Kabana, R. (1986). Organic and inorganic nitrogen amendments to soil as nematode suppressants. *Journal of Nematology*, *18*(2), 129.

Romuald, K. (2009). Caractérisation biochimique des enzymes liées aux réactions de défense de l'ananas et du bananier en réponse aux stress. Master de l'université de Poitiers, 1-45.

Ruiz, M., Vo, A. D., Becker, J. O., and Roose, M. L. (2023). Real-time PCR to Phenotype resistance to the citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. *Plants*, *12*(13), 25-43.

Rumiani, M., Hamzehzarghani, H., Karegar, A., Ghaderi, R., and Zouhar, M. (2023). A soil sampling method to estimate the population density of *Tylenchulus semipenetrans* cobb, 1913 in infested citrus orchards of the Fars province in southern Iran. *European Journal of Plant Pathology*, *165*(1), 27-40.

Saadoon, S. M., Sergany, M. I., Mona, H. E., Reham, A. M., and Gad, S. B. (2022). The Efficiency of Using Some Natural Compounds for Management of Citrus Nematode Tylenchulus semipenetrans. *Arab Journal of Plant Protection*, *40*(4), 346-350.

Saeed, M., Mukhtar, T., and Rehman, M. A. (2019). Temporal fluctuations in the population of citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans*) in the Pothowar region of Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, *51*(6), 2257.

Sangwan, N. K., Verma, B. S., Verma, K. K., and Dhindsa, K. S. (1990). Nematicidal activity of some essential plant oils. *Pesticide Science*, *28*(3), 331-335.

Saranya, S., Teli, B., Purohit, J., Singh, R. K., and Chattopadhyay, A. (2021). Nematophagous fungi in antioxidant-mediated defense against plant parasitic nematodes. *Antioxidants in Plant-Microbe Interaction*, 607-622.

S**asanelli, N., Konrat, A., Migunova, V., Toderas, I., Iurcu-Straistaru, E., Rusu, S., Bivol, A., Andoni, C., and Veronico, P. (2021)**. Review on Control Methods against Plant Parasitic Nematodes Applied in Southern Member States (C Zone) of the European Union. *Agriculture*, *11*(7), 602.

Salahi Ardakani, A., Tanha Mafi, Z., Mokaram, A., and Mohammadi Goltapeh, E. (2014). Relationship between soil properties and abundance of *Tylenchulus semipenetrans* in citrus

orchards, Kohgilouyeh va Boyerahmad Province. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16(7), 1699-1710.

Sarven, M. S., Aminuzzaman, F. M., and Huq, M. E. (2019). Dose-response relations between *Purpureocillium lilacinum* PLSAU-1 and *Meloidogyne incognita* infecting brinjal plant on plant growth and nematode management : A greenhouse study. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(26), 1-9.

Savicka, M., and Škute, N. (2010). Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (Triticum aestivum L.). *Ekologija*, *56*(1), 26-33.

Šibul, F., Orčić, D., Berežni, S., Anačkov, G., and Mimica-Dukić, N. (2019). HPLC–MS/MS profiling of wild-growing scentless chamomile. *Acta Chromatographica*, *32*(2), 86-94.

Schouteden, N., De Waele, D., Panis, B., and Vos, C. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi for the biocontrol of plant-parasitic nematodes : A Review of the Mechanisms Involved. *Frontiers in Microbiology*, 6. 1280.

Scotto la Massése, C., Vassy, R., and Zaouchi, H. (1975). Influence of three rootstocks on the yield of two citrus varieties in Algeria and on infestation by *Tylenchulus semipenetrans*. *Nematologia Mediterranea*, *3*(1), 29-34.

Seo, B. J. (2012). Bacterial mixture from greenhouse soil as a biocontrol agent against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, on Oriental Melon. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *22*(1), 114-117.

Seo, S.-M., Kim, J., Koh, S.-H., Ahn, Y.-J., and Park, I.-K. (2014). Nematicidal activity of natural ester compounds and their analogues against pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, *62*(37), 9103-9108.

Shanmugam, G., Mohankumar, A., Sundararaj, P., and Kannan, S. (2021). Spatial distribution of nematode genera in relation to host plants of Western Ghats, Tamil Nadu, India. *Acta Ecologica Sinica*, *41*(3), 189-192.

Shokoohi, E., and Duncan, L. W. (2018). Nematode parasites of citrus. *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*, 446-476.

Šibul, F., Orčić, D., Berežni, S., Anačkov, G., and Mimica-Dukić, N. (2019). HPLC–MS/MS profiling of wild-growing scentless chamomile. *Acta Chromatographica*, *32*(2), 86-94.

Siddiqi, M. R. (2000). *Tylenchida : Parasites of plants and insects*, 1-21.

Siddique, S., and Grundler, F. M. (2018). Parasitic nematodes manipulate plant development to establish feeding sites. *Current opinion in microbiology*, *46*, 102-108.

Siddiqui, I. A., and Shaukat, S. S. (2003). Endophytic bacteria : Prospects and opportunities for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Nematologia Mediterranea*, 31(1),1-12.

Silva, W. R., Machado, A. R., Campos, V. A., Zeri, A., Campos, V. P., and Oliveira, D. F. (2013). Volatile organic compounds for the control of *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. *Tropical Plant Pathology*, *38*, 375-386.

Singh, S., and Mathur, N. (2010). Biological control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting tomato. *Biocontrol Science and Technology*, *20*(8), 865-874.

Smirnoff, N. (1995). Antioxidant systems and plant response to the environment. *Environment and plant metabolism: Flexibility and acclimation*, 243-317.

Soares, F. E. de F., Sufiate, B. L., and de Queiroz, J. H. (2018). Nematophagous fungi : Far beyond the endoparasite, predator and ovicidal groups. *Agriculture and Natural Resources*, *52*(1), 1-8.

Soliman, M. S., El-Deriny, M. M., Ibrahim, D. S. S., Zakaria, H., and Ahmed, Y. (2021). Suppression of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato plants using the nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* Fresenius. *Journal of Applied Microbiology*, *131*(5), 2402-2415.

Sorribas, F. J., Verdejo-Lucas, S., Forner, J. B., Alcaidel, A., Pons, J., and Ornat, C. (2000). Seasonality of *Tylenchulus semipenetrans* Cobb and Pasteuria sp. In Citrus Orchards in Spain. *Journal of Nematology*, *32*(4S), 622-632.

Sorribas, F. J., Verdejo-Lucas, S., Pastor, J., Ornat, C., Pons, J., and Valero, J. (2008). Population Densities of *Tylenchulus semipenetrans* related to physicochemical properties of soil and yield of clementine mandarin in Spain. *Plant Disease*, *92*(3), 445-450.

Sousa, R. M. O., Rosa, J. S., Silva, C. A., Almeida, M. T. M., Novo, M. T., Cunha, A. C., and Fernandes-Ferreira, M. (2015). Larvicidal, molluscicidal and nematicidal activities of essential oils and compounds from *Foeniculum vulgare*. *Journal of Pest Science*, *88*, 413-426.

Spann, T. M., and Schumann, A. W. (2010). Mineral Nutrition Contributes to plant disease and pest resistance : HS1181/HS1181, 7/2010. *EDIS*, *2010*, 4, 1-5.

Sumenkova, N. I. (1989). Nematodes of plants and soils. *Neotylenchoidea*, 85, 1-1121.

Sunartoi, T., and Ntasasmita, S. (2011). Resistance level of some citrus cultivars to the citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans* Cobb.) in west Java, Indonesia. *Lucrari Ştiinţifice*, 54(1) 11-14.

Swingle, W. T. (1943). Botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily (family *Rutaceae*, subfamily *Aurantioidea*e. *International System for Agricultural Science and Technology*, 953-1021.

Taamalli, A., Arráez-Román, D., Abaza, L., Iswaldi, I., Fernández-Gutiérrez, A., Zarrouk, M., and Segura-Carretero, A. (2015). LC-MS-based metabolite profiling of methanolic extracts from the medicinal and aromatic species *Mentha pulegium* and *Origanum majorana*. *Phytochemical Analysis*, *26*(5), 320-330.

Talwana, H. L., Butseya, M. M., and Tusime, G. (2008). Occurence of plant parasitic nematodes and factors that enhance population build-up in cereal-based cropping systems in Uganda. *African Crop Science Journal*, *16*(2), 119 - 131.

Tamokou, J. D. D., Mbaveng, A. T., and Kuete, V. (2017). Antimicrobial activities of African medicinal spices and vegetables. In *Medicinal spices and vegetables from Africa*, 207-237.

Taylor, D. P., and Netscher, C. (1974). An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. *Nematologica*, *20*(2), 268-269.

Taylor, R. A. J. (2019). Chapter 7—Nematodes and other worms. In R. A. J. Taylor (Éd.), Taylor's Power Law. *Academic Press*, 143-234.

Thorne, G. (1962). Principles of Nematology. *Soil Science*, *93*(1), 70.

Tian, B., Yang, J., and Zhang, K.-Q. (2007). Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes : Populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*, *61*(2), 197-213.

Topalović, O., Hussain, M., and Heuer, H. (2020). Plants and Associated soil microbiota cooperatively suppress plant-parasitic nematodes. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 313.

Traoré, M., Lompo, F., Thio, B., Ouattara, B., Ouattara, K., and Sedogo, M. (2012). Influence de la rotation culturale, de la fertilisation et du labour sur les populations de nématodes phytoparasites du sorgho (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Biotechnol. Agron. Soc. Enviro*, 16(1), 59-66.

Tsai, B. Y., and Van Gundy, S. D. (1989). Comparison of anhydrobiotic ability of the citrus nematode with other plant parasitic nematodes. Proceedings of the sixth international citrus congress Middle-East, Tel Aviv, Israel, 6-11 March 1988. *Margraf Scientific Publishers*, 2(17), 983-992.

Tsao, R., and Yu, Q. (2000). Nematicidal activity of monoterpenoid compounds against economically important nematodes in agriculture. *Journal of Essential Oil Research*, *12*(3), 350-354.

Turatto, M. F., Dourado, F. dos S., Zilli, J. E., and Botelho, G. R. (2018). Control potential of *Meloidogyne javanica* and *Ditylenchus* spp. Using fluorescent *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1), 54-58.

Uludamar, E. B. K., Çimen, B., and Elekcioğlu, H. (2021). Doğu Akdeniz Bölgesi'nde doğa koşullarında bazı turunçgil anaçlarının Turunçgil nematodu'na [*Tylenchulus semipenetrans* (Cobb, 1913) (*Tylenchida : Tylenchulidae*)] karşı dayanıklılığının araştırılması. *Plant Protection Bulletin*, 61(1), 41-47.

Vaghasiya, T. P., Kumar, A., and Nakum, K. (2022). A Review on Wide Range Application of Nanoparticles in Agriculture and its Implications in Plant Disease Management. *J. Nanoworld*, *8*, 55-65.

Van Gundy, S. D., and Meagher, J. W. (1977). Citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans*) problems world-wide. *International Citrus Congress, Orlando, Florida*, *89*.

VanGundy, S. D., and Martin, J. P. (1962). Soil texture, pH, and moisture effects on development of citrus nematode (*Tylenchulus-semipenetrans*). *Phytopathology*, *52*(1), 31.

Veiga, A., Maria da Graça, T. T., Rossa, L. S., Mengarda, M., Stofella, N. C., Oliveira, L. J., Gonçalves, A. G., and Murakami, F. S. (2019). Colorimetric microdilution assay : Validation of a standard method for determination of MIC, IC 50%, and IC90% of antimicrobial compounds. *Journal of microbiological methods*, *162*, 50-61.

V**enkatesh, R., Harrison, S. K., and Riedel, R. M. (2000).** Weed hosts of soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) in Ohio1. *Weed Technology*, *14*(1), 156-160.

Verdejo-Lucas, S., Galeano, M., Sorribas, F. J., Forner, J. B., and Alcaide, A. (2003). Effect on Resistance to *Tylenchulus semipenetrans* of hybrid citrus rootstocks subjected to continuous exposure to high population densities of the nematode. *European Journal of Plant Pathology*, *109*(5), 427-433.

Verdejo-Lucas, S., and Kaplan, D. T. (2002). The citrus nematode : *Tylenchulus semipenetrans*. In *Plant resistance to parasitic nematodes*. CABI Publishing Wallingford UK, 207-219.

Verdejo-Lucas, S., and McKenry, M. V. (2004). Management of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans. Journal of Nematology*, *36*(4), 424.

Verdejo-Lucas, S., Sorribas, F. J., Galeano, M., Pastor, J., and Pons, J. (2023a). Resistance of the citrus rootstock forner-alcaide 5 to *Tylenchulus semipenetrans* in replant situations. *Crop Protection*, *167*, 106199.

Verschoor, B. C. (2002). Carbon and nitrogen budgets of plant-feeding nematodes in grasslands of different productivity. *Applied Soil Ecology*, *20*(1), 15-25.

Vilardebo, A. (1964). Etude sur *Tylenchulus semipenetrans* Cobb au Maroc. *AI Awamia Revue d'Agronomie Marocaine*, *11*, 31-49.

Vilardebo, A., and Luc, M. (1961). Le « Slow decline » des citrus dû au nématode *Tylenchulus semipenetrans* COBB. *Fruits*, 16(9), 445-454.

Viljoen, J. J. F. (Johannes), Labuschagne, N., Fourie, H., and Sikora, R. A. (2019). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognit*a on tomatoes and carrots by plant growth-promoting rhizobacteria. *Tropical Plant Pathology*, 44, 284-291.

Vives-Peris, V., De Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., and Pérez-Clemente, R. M. (2020). Root exudates : From plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports*, *39*(1), 3-17.

Vos, C., Van Den Broucke, D., Lombi, F. M., De Waele, D., and Elsen, A. (2012). Mycorrhiza-induced resistance in banana acts on nematode host location and penetration. *Soil Biology and Biochemistry*, 47, 60-66.

Wajid, M., Mahmood, A., Anwar, H., Hamid, M. I., Xiao, Y., Shafqat, M., and Nasir, S. (2020). Non-chemical based management of *Tylenchulus semipenetrans*, a major threat to the citrus industry. *World Journal of Biology and Biotechnology*, 5(3), 27-31

Walali Loudyi, D. E. M., Skiredj, A., and Hassan, E. (2003). Fiches techniques : Le bananier, la vigne et les agrumes. *Transfert des technologies en agriculture*, 1-4.

Walker, G. E., and Morey, B. G. (1999). Effect of brassica and weed manures on abundance of *Tylenchulus semipenetrans* and fungi in citrus orchard soil. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *39*(1), 65-72.

Walode, N. B., Sinha, A. K., and Neog, P. P. (2008). Biological control of citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans* on *Citrus jambhiri*. *Indian Journal of Nematology*, *38*(2), 244-246.

Wang, C., Bruening, G., and Williamson, V. M. (2009). Determination of preferred pH for root-knot nematode aggregation using pluronic F-127 gel. *Journal of Chemical Ecology*, *35*, 1242-1251.

Wang, L., Gao, K., Fan, Z., Hao, W., Zhan, J., Xing, R., Liu, S., Li, P., and Qin, Y. (2023). Ecofriendly management of plant-parasitic nematodes in cucumber with natural products from sea-derived *Aspergillus luchuensis* Hy-6. *SSRN Scholarly Paper 4406155*. 35p.

Wei, J.-Z., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S.-C., and Aroian, R. V. (2003). Bacillus thuringiensis crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(5), 2760-2765.

Weng, W., Yan, J., Zhou, M., Yao, X., Gao, A., Ma, C., Cheng, J., and Ruan, J. (2022). Roles of arbuscular mycorrhizal fungi as a biocontrol agent in the control of plant diseases. *Microorganisms*, 10(7), 1266.

Wilschut, R. A., and Geisen, S. (2021). Nematodes as drivers of plant performance in natural systems. *Trends in Plant Science*, *26*(3), 237-247.

Xiang, C., Liu, Y., Liu, S.-M., Huang, Y.-F., Kong, L.-A., Peng, H., Liu, M.-Y., Liu, J., Peng, D.-L., and Huang, W.-K. (2020). Aβ-Dehydrocurvularin isolated from the fungus *Aspergillus welwitschiae* effectively inhibited the behaviour and development of the root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* in rice roots. *BMC Microbiology*, *20*(1), 1-10.

Yahia, W. A., Elkhawaga, M. A., Mahfouz, A. Y., and Attia, M. S. (2023). Achieving green synthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus ustus* ON076464 for improving immune response and vegetative growth of pepper plant towards wilt disease caused by *Fusarium oxysporum*. *Egyptian Journal of Chemistry*, *66*(7), 131-151.

Yao, G., Bai, X., Zhang, B., Wang, L., Chen, S., and Wang, Z. (2022). Enhanced production of terrein in marine-derived *Aspergillus terreus* by refactoring both global and pathway-specific transcription factors. *Microbial Cell Factories*, *21*(1), 136.

Yeates, G. W., Bongers, T., De Goede, R. G., Freckman, D. W., and Georgieva, S. (1993). Feeding habits in soil nematode families and genera—An outline for soil ecologists. *Journal of nematology*, *25*(3), 315.

Yeon, J., Park, A. R., Kang, M., Nguyen, V. T., Lee, Y., Kim, H. M., Park, H. W., Ha, P., Koo, Y., and Kim, J.-C. (2023). Control of root-knot nematodes on tomato by eliciting resistance through Aspergillus niger-derived oxalic acid. *Journal of Pest Science*, *96*(3), 1287-1299.

Yin, N., Liu, R., Zhao, J.-L., Khan, R. A. A., Li, Y., Ling, J., Liu, W., Yang, Y.-H., Xie, B.-Y., and Mao, Z.-C. (2021). Volatile organic compounds of *Bacillus cereus* strain bc-cm103 exhibit fumigation activity against Meloidogyne incognita. *Plant Disease*, *105*(4), 904-911.

Youssef, M. M., El-Nagdi, W. M., and Lotfy, D. E. (2020). Evaluation of the fungal activity of Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae and Paecilomyces lilacinus as biocontrol agents against root-knot nematode, Meloidogyne incognita on cowpea. Bulletin of the National Research Centre, 44(112), 1-11.

Yüksel, E., Imren, M., Özer, G., Bozbuğa, R., Dababat, A. A., and Canhilal, R. (2023). Occurrence, identification, and diversity of parasitic nematodes in apple (Malus domestica Borkh.) orchards in the Central Anatolia Region of Türkiye. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 130(2), 1-16.

Zacheo, G., Arrigoni-Liso, R., Bleve-Zacheo, T., Lamberti, F., and Arrigoni, O. (1983). Mitochondrial peroxidase and superoxide dismutase activities during the infection by *Meloidogyne incognita* of susceptible and resistant tomato plants. *Nematologia mediterranea*, 11(2), 107-114.

Zacheo, G., Bleve-Zacheo, T., and Pricolo, G. (1987). Metabolic changes in enzyme levels in potato roots infested by potato cyst nematodes, *Globodera pallida* (Pa3) and *Globodera rostochiensis* (Ro1). *Nematologia mediterranea*, 15(2), 293-302.

Zerhoune, M., Ossama, K., Said, E.-N., Lhoussain, A. H., Loubna, M. B., and Mustapha, L.

(2021). Equipe chargée de la réalisation du Projet : Gestion rationnelle de l'irrigation en vergers d'agrumes dans le périmètre irrigué de l'Oriental. *Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès*.

Zhang, S. S., and Xu, M. Y. (1994). Identification of citrus root-knot nematode in Fujian province and its control. *China Citrus*, *23*(1), 9-11.

Zhao, X., Qi, G., Feng, Y., and Du, C. (2023). Application of nematicide avermectin enriched antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in farmland soil. *Environmental Research*, *227*, 115802.

Zhao, D., Zhao, H., Zhao, D., Zhu, X., Wang, Y., Duan, Y., Xuan, Y., and Chen, L. (2018). Isolation and identification of bacteria from rhizosphere soil and their effect on plant growth promotion and root-knot nematode disease. *Biological Control*, *119*, 12-19.

Zhou, X., Yu, G., and Wu, F. (2011). Effects of intercropping cucumber with onion or garlic on soil enzyme activities, microbial communities and cucumber yield. *European Journal of Soil Biology*, *47*(5), 279-287.

ANNEXES

Annexe I : Préparation des réactifs A, B et AB

Réactif A : Molybdate de sodium 2.5% : dissoudre 2,5 g de molybdate de Sodium dans100 ml d'H2S04 (10N) 60

Réactif B : Sulfate d'hydrazine 0.15% : dissoudre 0.15 g de Sulfate d'hydrazine dans 100 ml l'eau distillée. Ces deux réactifs peuvent être conservés séparément au réfrigérateur jusqu'a le jour de dosage

Réactif AB : Prendre 20 ml du réactif A+10 ml de réactif B et compléter à 100ml avec de l'eau distillé.

Annexe II. Milieux de cultures utilisés pour l'isolement des micro-organismes telluriques

- ✓ **Milieu pour l'isolement des bactéries**

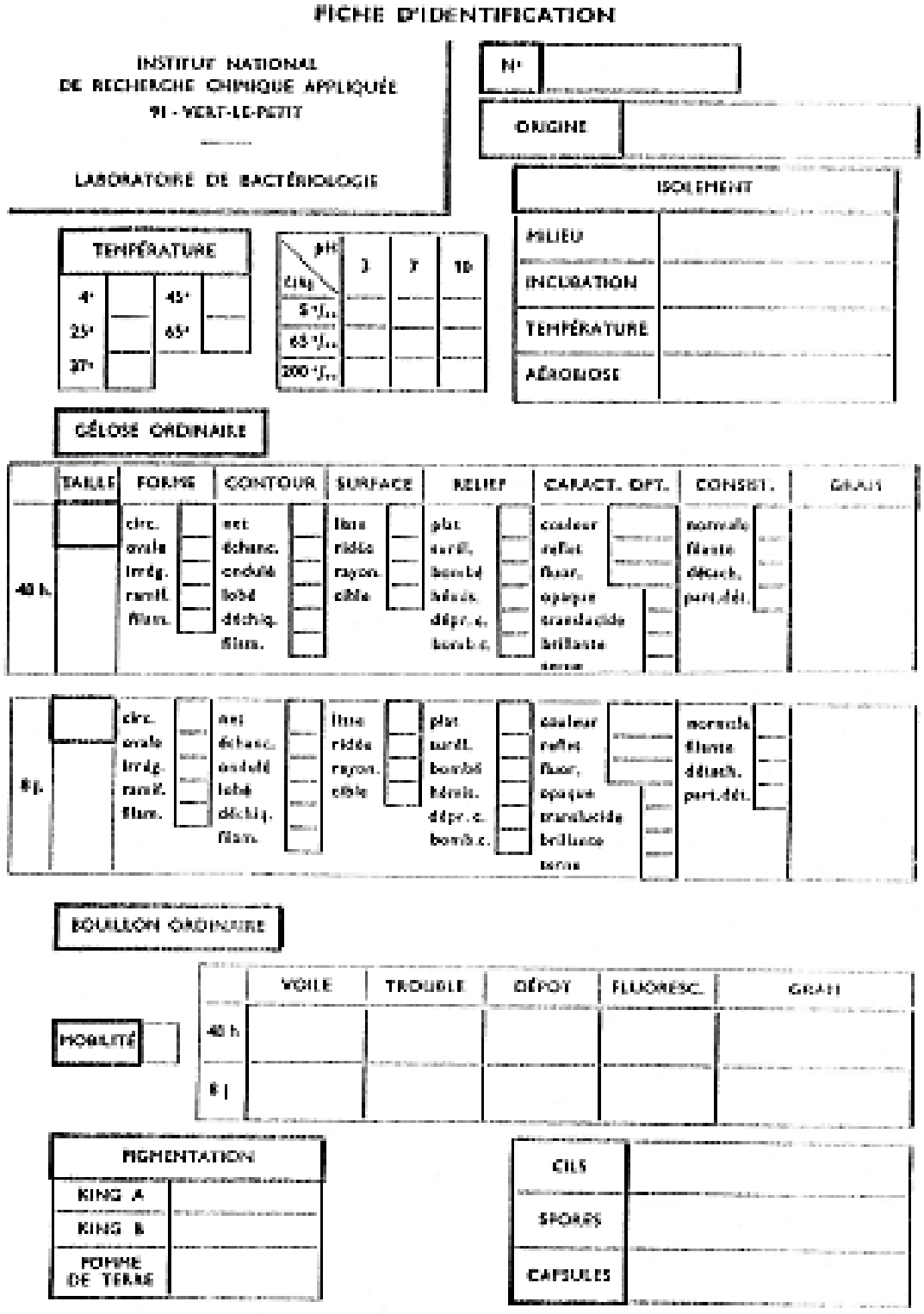
Extrait de levure…….	5g
Peptone……	10g
Chlorure de sodium…….	5g
Extrait de racines et/ou sol……..	70 ml
Agar-agar…….	20g
Eau de puits q.s.p …….	1000 ml

- ✓ **Milieu pour les moisissures**

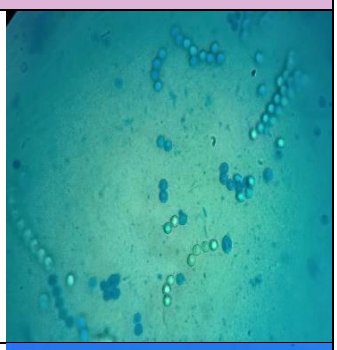
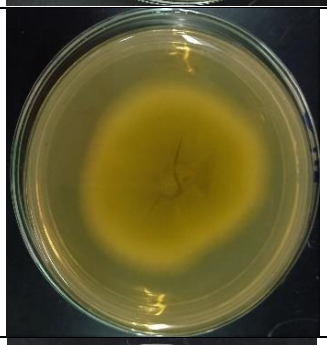
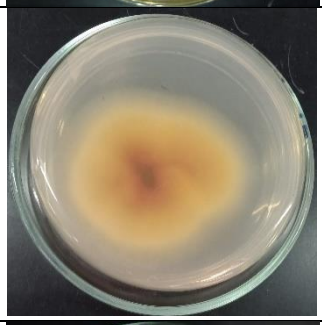
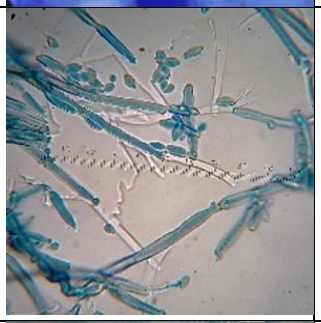
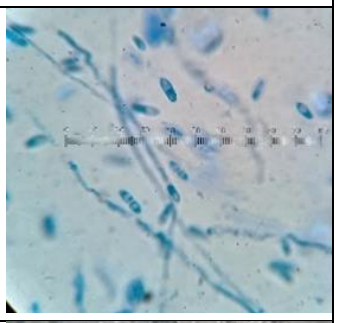
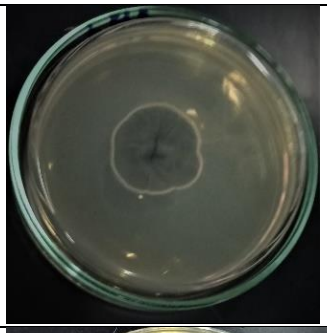
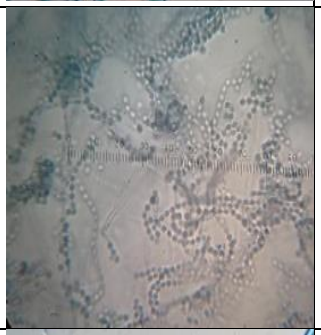
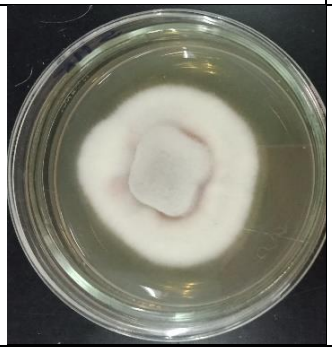
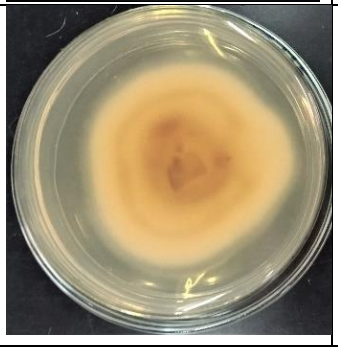
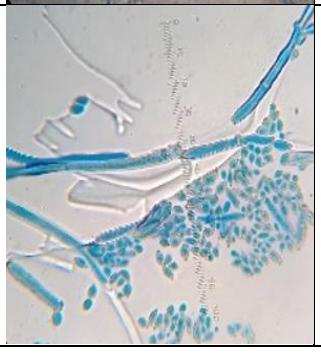
Extrait de malt …….	20g
Extrait de racines et/ou sol …….	70 ml
Agar-agar…….	20g
Eau de puits q.s.p ……	1000 ml

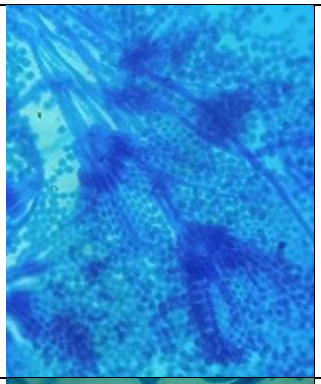
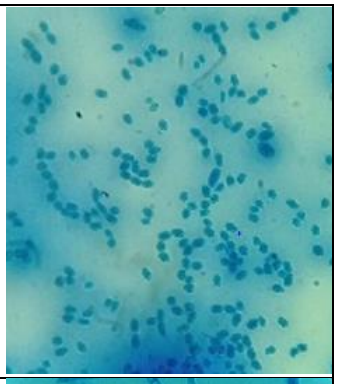
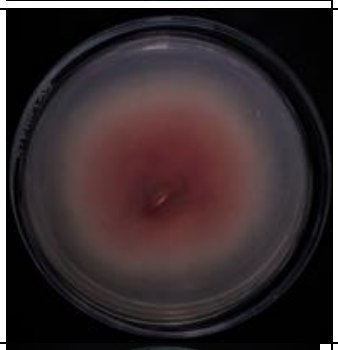
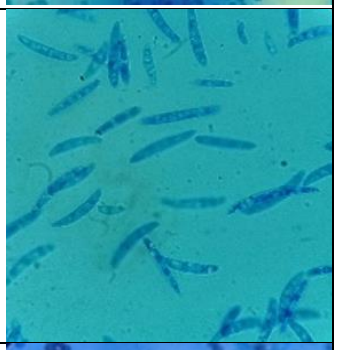
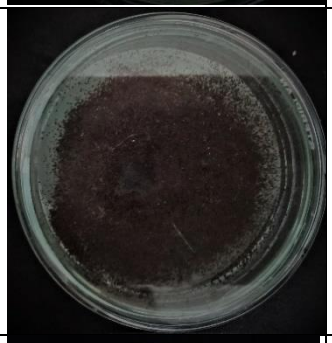
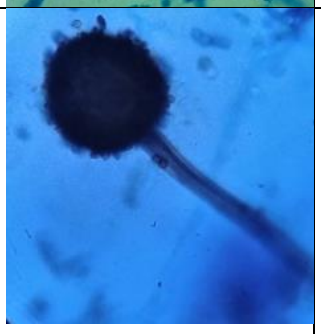
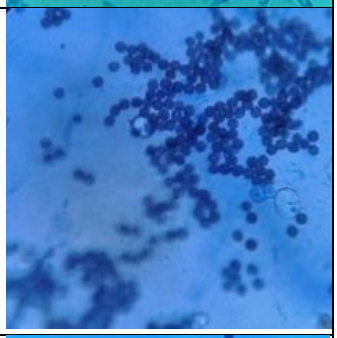
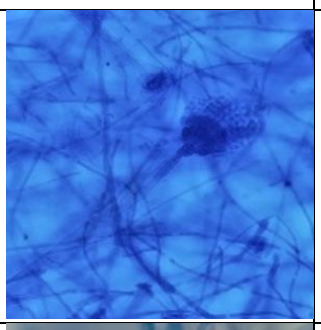
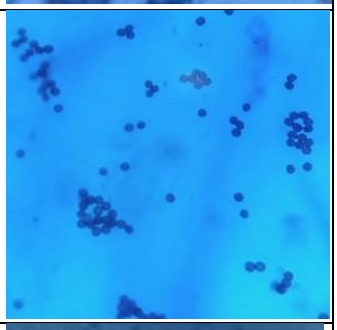
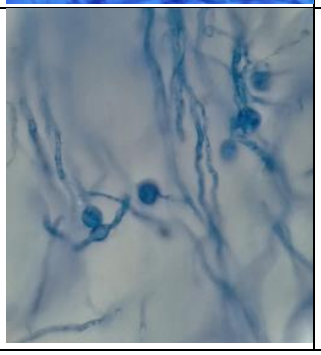
Une solution de sulfate de streptomycine à 0.075% (p/v) dans l'eau distillée stérile, est ajoutée à raison de 4% (v/v) au milieu Après autoclavage à 120°C pendant 20 min et refroidissement à environ 45°C.

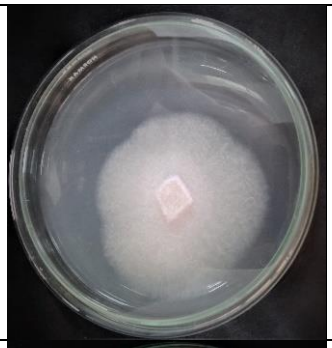
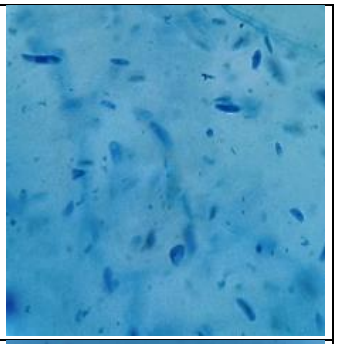
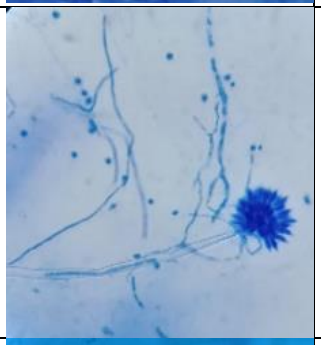
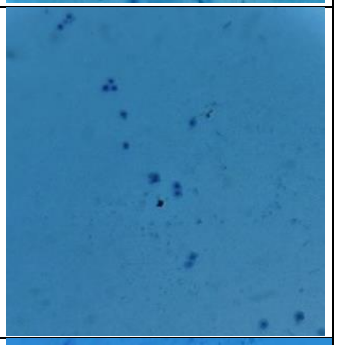
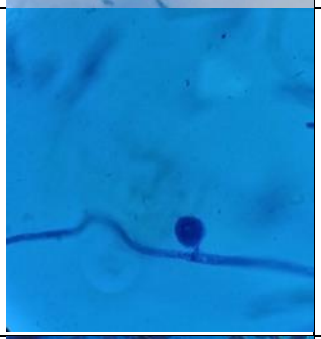
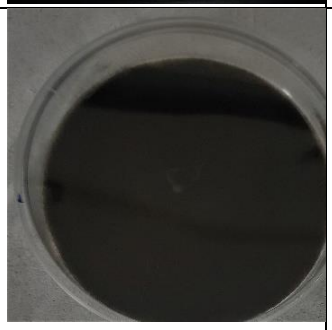
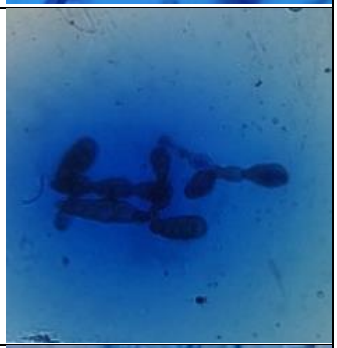
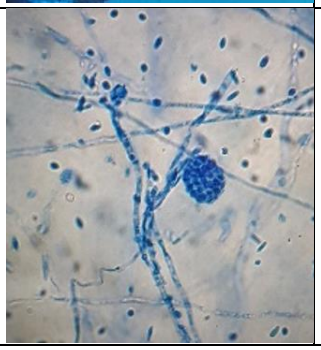
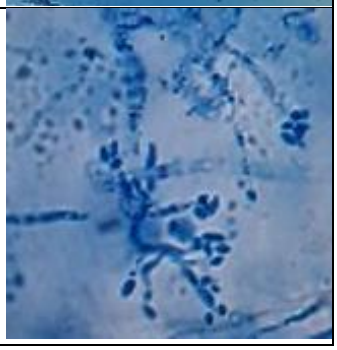
Annexe III. Fiche d'identification des bactéries hétérotrophes selon Prévot.

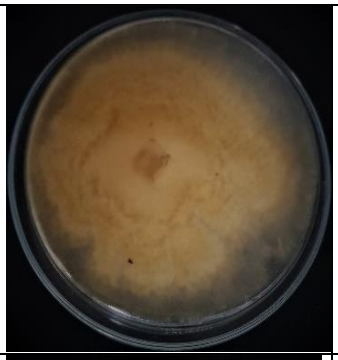
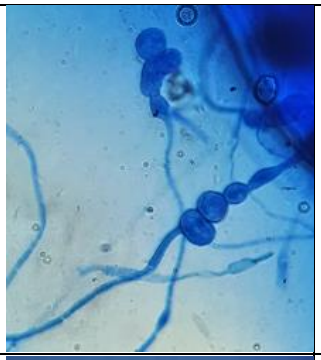
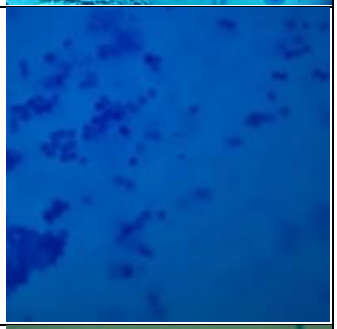
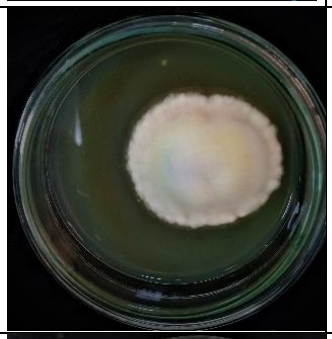
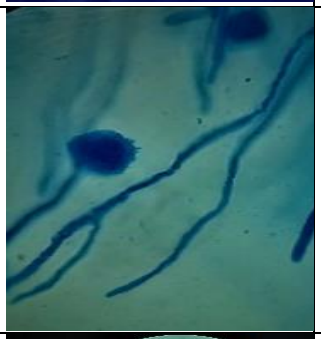
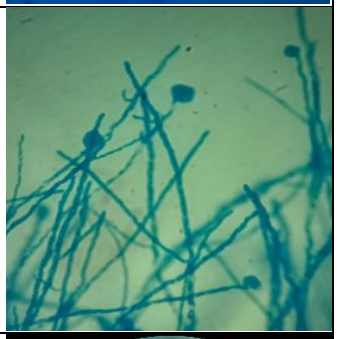
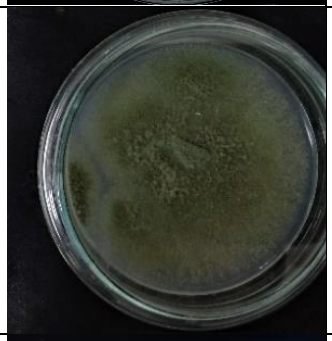
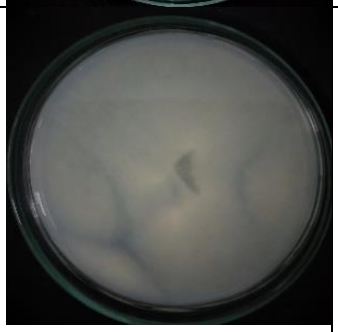
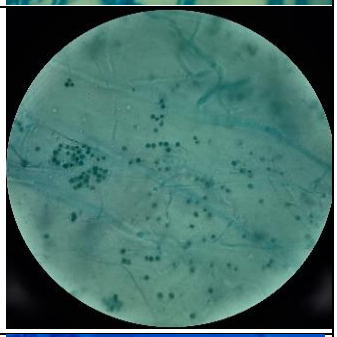
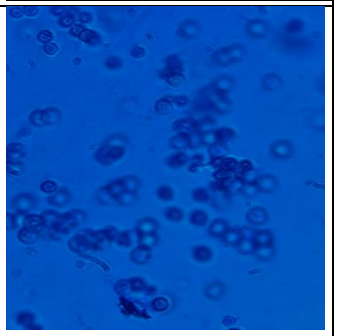


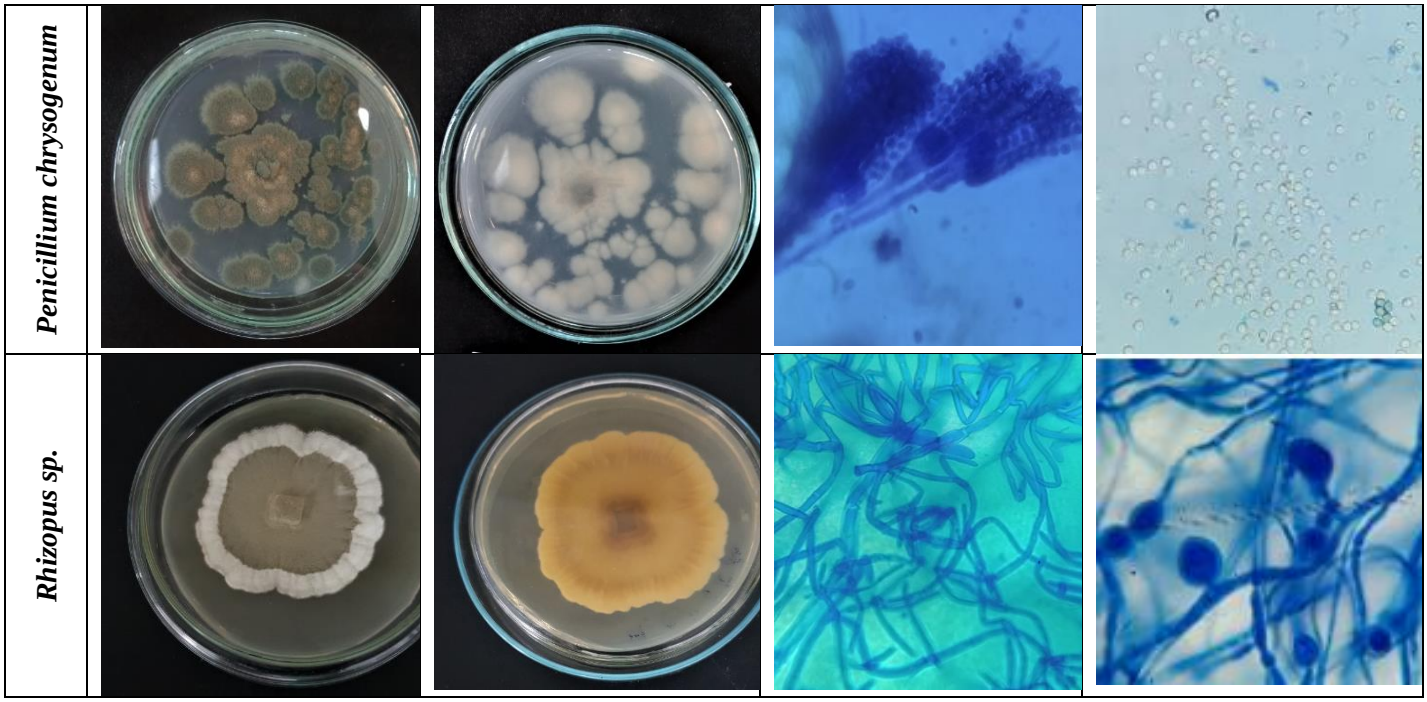
Annexe IV. Caractéristiques macro et microscopiques des groupes microbiens fongiques isolés à partir de racines et de sol des agrumes.

	Caractéristiques macroscopiques		Caractéristiques microscopiques	
Penicillium expansum				
Aspergilus ustrus				
Fusarium oniliforme				
Cladosporium cladosporiodes				
Fusarium moniliform				

***Penicillium* sp.**				
Fusarium oxysporum				
Aspergillus niger				
Aspergillus sp.				
Pythium schmithenneri				

Fusarium sp.				
Aspergillus versicolor				
Fusarium solani				
Alternaria sp.				
Beauveria sp.				

Verticillium spp.				
Aspergillus sp.				
Rhizopus sp.				
Aspergillus flavus				
Aspergillus terreus				



Annexe V. Aspects macroscopiques des isolats bactériens nématicides isolés à partir de racines et de sol des agrumes et purifiés sur le milieu LB.



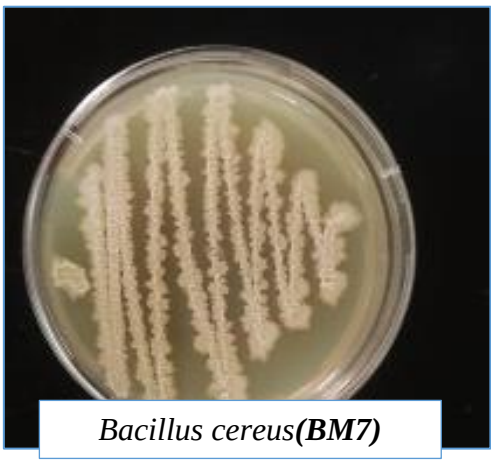
*Bacillus simplex (***BM12***)*



Paracoccus speluncae (**BR21)**



*Variovorax paradoxus (***B6')**



*Bacillus cereus****(BM7)***



Bacillus pseudomycoides (**B1***)*

Annexe VI. Attestation de participation au ‘’Youth Fellowship Program’’ lors de l’Annual Meetings du Fonds Monétaire International et de la banque mondiale organisé à Marrakech entre le 9 et 15 octobre 2023. bt



Certificate of Participation

The International Monetary Fund recognizes

BTISSAM ZOUBI

for participating in the 2023 Annual Meetings
Youth Fellowship Program

GITA GOPINATH
First Deputy Managing Director

JULIE KOZACK
Director
Communications Department

Annexe VII. Nos publications dans des revues reconnues par les bases de données Web of Science et Scopus.



Taylor & Francis

Archives of Phytopathology and Plant Protection

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: https://www.tandfonline.com/loi/gapp20

Eco-friendly management of the citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans* using some aromatic and medicinal plants

Btissam Zoubi, Fouad Mokrini, Mohammed Amer, Ghoulam Cherki, Meriem Rafya, Abderrazak Benkebboura, Oumaima Akachoud, Salah-Eddine Laasli, Abdelilah Iraqi Housseini, Abdelfattah A. Dababat, Rachid Lahlali & Ahmed Qaddoury



life

MDPI

Article

Occurrence and Geographic Distribution of Plant-Parasitic Nematodes Associated with Citrus in Morocco and Their Interaction with Soil Patterns

Btissam Zoubi [1,2,3], Fouad Mokrini [2,*], Abdelfattah A. Dababat [4,*], Mohammed Amer [5], Cherki Ghoulam [3], Rachid Lahlali [6], Salah-Eddine Laasli [7], Khalid Khfif [8], Mustafa Imren [9], Oumaima Akachoud [3], Abderrazak Benkebboura [3], Abdelilah Iraqi Housseini [1] and Ahmed Qaddoury [3,*]

