



# NEWSLETTER

N° 4 - Juillet 2023

## Bulletin d'information par le projet Prometeo cofinancé par l'Union Européenne par le biais du Programme IEV de Coopération Transfrontalière "Italie-Tunisie" 2014-2020

Le Programme IEV CT "Italie-Tunisie" 2014-2020 est un programme bilatéral de coopération transfrontalière cofinancé par l'Union Européenne dans le cadre de l'Instrument Européen de Voisinage de partenariat (IEV). Avec une allocation financière de 33,3 millions d'euros, le programme - dont la gestion commune a été confiée au bureau de la Programmation de la Région Sicile - a pour but d'encourager un développement économique, social et territorial juste, équitable et durable, en vue de favoriser l'intégration transfrontalière et de valoriser les territoires et les atouts des deux Pays participants. <https://www.italietunisie.eu/>

Résumé du bulletin d'information:

Protocoles scientifiques en  
Pathologie Végétale .....p.1

Anthraxose de l'amande .p.2

Dépérissement  
de l'amande .....p.7

Tache noire des agrumes .....p.9

Mal secco des agrumes .....p.12

Dépérissement  
de l'olivier .....p.17

## ÉDITION SPÉCIALE : PROTOCOLES SCIENTIFIQUES DE PATHOLOGIE VÉGÉTALE DU PROJET PROMETEO

Ce numéro spécial du bulletin périodique de Prometeo a également un caractère purement scientifique et est entièrement consacré à la publication des premiers protocoles scientifiques de la Pathologie Végétale, qui sont le résultat des activités de recherche et des discussions entre les experts scientifiques et les parties prenantes du projet Prometeo, dans le but de créer un réseau transfrontalier de collaboration entre chercheurs, entreprises et autres acteurs italiens et tunisiens pour encourager le développement de

solutions techniques innovantes et durables pour la protection de ces cultures contre les organismes pathogènes de quarantaine ou les ravageurs émergents, qui menacent leur rentabilité et leur survie.

Les résultats seront utiles pour orienter les politiques agricoles, renforcer les services phytosanitaires, accroître l'efficacité de la production, la compétitivité et la durabilité de ces secteurs et améliorer les normes de qualité en matière de sécurité alimentaire.

Bonne lecture!

# Almond anthracnose - Anthracnose de l'amande - Antracnosi del mandorlo *Colletotrichum* spp.

L'antracnose de l'amande (AA) causée par *Colletotrichum* spp. a été décrite comme l'une des maladies les plus importantes de cette culture de noix dans les principales régions de production d'amandes dans le monde, notamment en Californie, en Australie, en Espagne et en Italie.

Actuellement, l'AA est considérée comme une maladie ré-émergente dans les pays du bassin méditerranéen en raison du déplacement des plantations des zones de culture d'origine vers d'autres avec des conditions climatiques, édaphiques et orographiques favorables à la culture et au rendement. Le pathogène affecte principalement les fruits à des stades de maturité très jeunes, provoquant des lésions déprimées, rondes et orange ou brunes avec une gomme abondante. Les fruits affectés peuvent tomber prématurément et entraîner le dessèchement des branches, causant des pertes économiques importantes lors des années d'épidémies (López-Moral et al., 2020).

## Diagnostic

### Sur le terrain - symptômes et signes

Le pathogène affecte principalement les fruits d'amande, mais les fleurs, les feuilles et les tissus ligneux peuvent également être affectés. Les fleurs infectées se flétrissent, souvent avec des gouttelettes orange de conidies sur la coupe florale (Palacio-Bielsa et al., 2017). Cependant, les symptômes les plus caractéristiques de la maladie sont observés sur les fruits verts. Les fruits infectés présentent des lésions déprimées, rondes et orange ou brunes de 5 à 12 mm de diamètre qui se développent à la surface des fruits au printemps-été et produisent une gomme abondante (**Figure 1a**).

Le diagnostic de la maladie est difficile dans les lésions incipientes car la couleur des zones affectées ne diffère pas clairement de l'épiderme asymptomatique. Lorsque les symptômes progressent, un mycélium blanchâtre abondant et des masses oranges de conidies sont produites à la surface des fruits infectés. Par la suite, les fruits se momifient (**Figure 1b**) et tombent prématurément au sol (Förster et al., 1999; López-Moral et al., 2017; Palacio-Bielsa et al., 2017; Peres et al., 2005).

Les momies qui restent dans le feuillage des arbres pendant l'automne et l'hiver seront la principale source d'inoculum pour l'infection de l'année suivante (**Figure 1c**). Bien que le pathogène cause principalement la pourriture des fruits, un syndrome secondaire consistant en une nécrose foliaire, une défoliation, une brûlure des pousses et un flétrissement des branches a également été observé chez les arbres gravement affectés (**Figure 1d**) (Adaskaveg et al., 2017; Förster et al., 1999; López-Moral et al., 2017). Les feuilles présentent une nécrose à partir des pointes et des marges et s'étendent à l'ensemble du limbe foliaire (**Figure 1e**) (Palazón et al., 1979).

Ce syndrome secondaire semble être causé par la translocation des toxines produites par le pathogène dans les fruits affectés restant dans le feuillage de l'arbre. Le pathogène peut être isolé de manière cohérente à partir des tissus affectés des fruits d'amande. Cependant, il ne peut pas être isolé des feuilles nécrotiques ainsi que du bois des pousses et des branches présentant une brûlure et un flétrissement, probablement parce que ce syndrome est causé directement par les phytotoxines, mais que le pathogène n'est plus présent dans les tissus (Adaskaveg et al., 2017; Förster et al., 1999; López-Moral et al., 2017).

### En laboratoire - isolement et caractéristiques des cultures

Isolement à partir de fruits symptomatiques. Les fruits affectés sont désinfectés en surface avec de l'eau de Javel commerciale (Cl à 50 g litre<sup>-1</sup>) à 10 % (vol/vol) dans de l'eau stérile pendant 1 minute, puis séchés à l'air sur du papier filtre stérile pendant 30 minutes. Les tissus affectés sont découpés à l'aide d'un scalpel stérile et placés sur de l'agar pomme de terre (PDA) (Difco Laboratories) contenant de la streptomycine (PDA+S). Lorsque les tissus de fruits affectés montrent une sporulation abondante du pathogène, des masses de conidies sont prélevées à l'aide d'une aiguille stérile et cultivées dans des boîtes de Pétri sur PDA+S. Les boîtes de Pétri sont

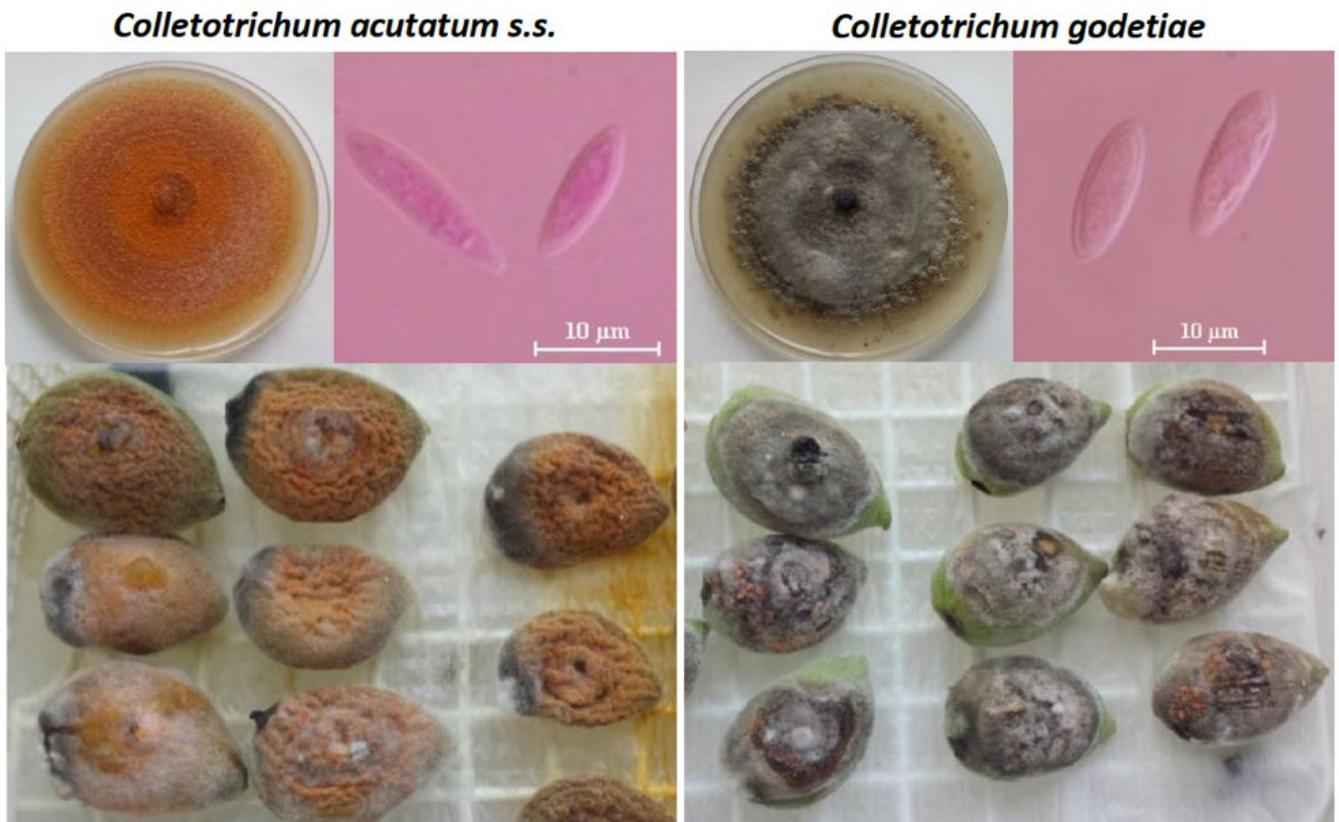


**Figure 1.** Symptômes caractéristiques de l'antracnose de l'amande causée par *Colletotrichum* spp. (a) lésions déprimées, enfoncées, rondes et orange sur les amandes vertes; (b) branche avec des fruits momifiés et des feuilles nécrotiques; (c) fruits momifiés provenant d'infections causées l'année précédente et restant dans le feuillage de l'arbre; (d) défoliation et flétrissement des pousses et des branches en conséquence des toxines produites par le pathogène; (e) lésions irrégulières nécrotiques aux extrémités et aux marges des feuilles (López-Moral et al., 2020).

incubées à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  sous un photopériode diurne de 12 heures de lumière fluorescente froide ( $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) pendant 5 jours, et des extrémités de l'hyphes des colonies sont transférées sur PDA et incubées comme décrit ci-dessus.

En général, les colonies fongiques de *Colletotrichum* spp. associées à l'AA présentent une croissance radiale avec des cercles concentriques et un mycélium aérien abondant sur PDA lorsqu'elles sont incubées à  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  avec un photopériode de 12 heures. La couleur des colonies varie du gris clair au gris foncé pour les isolats de *C. godetiae* (sous-population grise); et du saumon au rose-orange pour les isolats de *C. acutatum* s.s. (Figure 2) ou de *C. fioriniae* (sous-populations rose-orange) (Förster et al., 1999; Freeman et al., 1998; López-Moral et al., 2017). La vitesse de croissance mycélienne varie de 3,0 à 6,0 mm/jour sur PDA à  $25^\circ\text{C}$  (Förster et al., 1999; López-Moral et al., 2017).

Bien que la morphologie des conidies puisse varier selon les espèces de *Colletotrichum*, la morphologie des conidies des isolats de *Colletotrichum* de l'amande n'est pas utile pour les distinguer entre les espèces. En général, toutes les espèces de *Colletotrichum* associées à l'AA présentent des conidies unicellulaires, hyalines avec deux extrémités pointues. De manière intéressante, les conidies de *C. godetiae* de l'amande présentent une morphologie similaire à celle de *C. acutatum* de l'amande (deux extrémités pointues dans les deux cas), alors que les conidies de *C. godetiae* d'autres hôtes tels que l'olive montrent généralement une seule extrémité pointue (López-Moral et al., 2017) (Figure 2). Cependant, ces différences morphologiques de la morphologie des conidies entre les isolats de *C. godetiae* de différents hôtes ne se traduisent pas par des différences génétiques lors de l'utilisation de six régions génomiques (López-Moral et al., 2017).



**Figure 2.** Colonies et conidies de *Colletotrichum acutatum* s.s. (isolat Col-506; sous-population rose-orange) et de *C. godetiae* (isolat Col-522; sous-population grise) identifiés comme agents causaux de l'antracnose de l'amande. Colonies cultivées sur PDA et sur des fruits d'amande inoculés à  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  avec un photopériode de 12 heures pendant 7 et 14 jours, respectivement. Barres d'échelle: (conidies) 10 µm (López-Moral et al., 2020).

## En laboratoire - détection moléculaire

### Extraction d'ADN

Pour l'ADN génomique, le mycélium fongique et les conidies issus de cultures à spores simples cultivées sur PDA à  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  avec un photopériode de 12 heures pendant 7 jours sont utilisés. L'ADN total est extrait à l'aide d'un kit commercial en suivant les instructions du fabricant. La concentration et la pureté de l'ADN extrait sont déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre MaestroNano (MaestroGen) (López-Moral et al., 2017).

### PCR conventionnelle

Six régions génomiques sont amplifiées et séquencées, comprenant le gène ribosomal nucléaire 5,8S avec deux séquences d'espaces transcrits internes flanquantes (ITS), un intron de 200 pb de la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), et des séquences partielles des gènes chitin synthase 1 (CHS-1), histone 3 (HIS3), actine (ACT), et  $\beta$ -tubuline (TUB2). Les paires d'amorces utilisées pour chaque région génomique, ainsi que leurs séquences, sont présentées dans le **Tableau 2**.



**Tableau 2.** Amorces utilisées pour amplifier les six régions génomiques étudiées par l'analyse d'ADN

Primer <sup>y</sup>	Primer pairs	Genomic sequence (5'-3')	Size (bp) <sup>z</sup>	Reference
ITS	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	540	White et al. 1990
	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	...	...
TUB2	BT2A	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	429	Glass and Donaldson 1995
	BT2B	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC	...	...
ACT	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	246	Carbone and Kohn 1999
	ACT783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	...	...
CHS-1	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGGGAAGAAG	282	Carbone and Kohn 1999
	CHS-354R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTC	...	...
HIS3	CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG	382	Crous et al. 2004
	CYLH3R	AGCTGGATGTCCCTGGACTG	...	...
GAPDH	GDF1	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	250	Guerber et al. 2003
	GDF1	GGGTGGAGTCGTAACCTGAGCATGT	...	...

<sup>y</sup> ITS = internal transcribed spacer, TUB2 =  $\beta$ -tubulin, ACT = actin, CHS-1 = chitin synthase 1, HIS3 = histone 3, and GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

<sup>z</sup> Expected polymerase chain reaction product.

### PCR en temps réel (TaqMan®) pour le diagnostic de *Colletotrichum* spp., *C. acutatum* et *C. gloeosporioides* à partir de cultures et de matériel végétal.

Le diagnostic, basé sur la PCR en temps réel, donne un résultat rapide, sensible et précis en 1 à 2 jours, permettant un dépistage à haut débit et peu coûteux des échantillons. Ces méthodes permettent également la détection des agents pathogènes à partir de matériel végétal asymptomatique artificiellement infecté. Les méthodes décrites pourraient s'avérer utiles pour étudier les voies épidémiologiques de ces agents pathogènes dans les champs et les pépinières. De plus, les méthodes pourraient être utilisées dans des enquêtes futures surveillant les populations fongiques, ou dans des études concernant la biologie et les stratégies d'infection de *Colletotrichum* spp. (Garrido et al., 2009)

Trois tests spécifiques (amorces et sondes TaqMan®), pour la détection et la discrimination de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* et *Colletotrichum* spp., sont conçus à l'aide du logiciel primer express™ (PE Biosystems).

Les sondes sont conçues avec FAM (6-carboxyfluorescéine) en tant que rapporteur et TAMRA (tétraméthylrhodamine) en tant qu'éteignoir; toutes les amorces et sondes sont synthétisées par MWG Biotech (Tableau 3).

**Tableau 3.** Séquences des amorces et sondes

Target	Primer/Probe	Orientation	Assay	Sequence 5'-3'	Target region (nucleotides)	EMBL accession
<i>Colletotrichum acutatum</i>	ACUT-F1	Forward	TaqMan®	CGG AGG AAA CCA AAC TCT ATT TAC A	122-146	EF694675
	ACUT-R1	Reverse		CCA GAA CCA AGA GAT CCG TTG	192-212	EF694675
	ACUT-PB	Probe		CGT CTC TTC TGA GTG GCA CAA GCA AAT AAT TAA A	150-183	EF694675
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	GLOE-F1	Forward	TaqMan®	GGC GGG TAG GGT CYC CG <sup>a</sup>	52-68	AJ536226
	GLOE-R2	Reverse		ACT CAG AAG AAA CGT CGT TAA ATC AG	128-153	AJ536226
	GLOE-PB	Probe		CTC CCG GCC TCC CGC CYC <sup>b</sup>	74-91	AJ536226
<i>Colletotrichum</i> spp.	COL GEN-F1	Forward	TaqMan®	TGC CTG TTC GAG CGT CAT T	320-338	EF694675
	COL GEN-R2	Reverse		CTA CGC AAA GGA GGC TCC G	413-431	EF694675
	COL GEN-PB	Probe		AAC CCT CAA GCW CYG CTT GGY KTT GG <sup>a</sup>	341-366	EF694675

Les amorces et sondes spécifiques pour *Colletotrichum acutatum* et *C. gloeosporioides* (Tableau 3) ont été conçues dans la région la plus divergente de la région ITS1 des espèces fongiques alignées. L'alignement de séquences multiples entre 307 séquences appartenant à 21 espèces de *Colletotrichum* et les séquences d'autres agents pathogènes végétaux connexes a permis la conception d'amorces et d'une sonde TaqMan® spécifiques pour le genre *Colletotrichum* dans les séquences divergentes de la région ITS2 du gène de l'ARNr (Garrido et al., 2009).

## Gestion

La lutte contre la maladie doit être basée sur un programme de lutte intégrée contre les ravageurs (LIR) visant à prévenir les infections. La prévention est particulièrement importante dans le cas de l'antracnose de l'amande car les espèces de *Colletotrichum* s'établissent lentement dans le verger sur plusieurs années, apparaissant lorsque les conditions environnementales sont favorables aux épidémies de maladies. Une fois que les symptômes de la maladie apparaissent, le contrôle de l'antracnose de l'amande devient difficile si la pression d'inoculum dans le champ est élevée. Ainsi, des mesures préventives, telles que les pratiques culturales, la résistance des cultivars et le contrôle biologique, doivent être prises en compte pour lutter contre les infections à *Colletotrichum*. Les traitements fongicides ne doivent être utilisés que pour prévenir les pertes économiques lors des années d'épidémies lorsque les mesures préventives ne sont pas suffisantes pour contrôler la maladie ou lorsque les vergers ayant un historique de maladie nécessitent des traitements préventifs. Toutes ces stratégies de gestion, ainsi qu'une mise à jour des études de recherche sur ce sujet, sont décrites en López-Moral et al., 2020.



## Références

1. Adaskaveg, J.E.; Gubler, W.D.; Duncan, R.; Stapleton, J.J.; Holtz, B.A.; Trouillas, F.P. UC IPM Pest Management Guidelines: Almond UC ANR, 2017. Publication 3431.
2. Förster, H.; Adaskaveg, J.E. Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California. *Phytopathology* 1999, 89, 1056-1065.
3. Freeman, S.; Katan, T.; Shabi, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Dis.* 1998, 82, 596-605.
4. Garrido, C.; Carbú, M.; Fernández-Acero, F.J.; Boonham, N.; Colyer, A.; Cantoral, J.M.; Budge, G., 2009. Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. *Plant Pathol.* 58, 43-51.
5. López-Moral, A.; Agustí-Brisach, C.; Lovera, M.; Arquero, O.; Trapero, A. Almond Anthracnose: Current Knowledge and Future Perspectives. *Plants* 2020, 9, 945.
6. López-Moral, A.; Raya-Ortega, M.C.; Agustí-Brisach, C.; Roca, L.F.; Lovera, M.; Luque, F.; Arquero, O.; Trapero, A. Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing almond anthracnose in Spain. *Plant Dis.* 2017, 101, 2034-2045.
7. Palacio-Bielsa, A.; Cambra, M.; Martínez, C.; Olmos, A.; Pallás, V.; López, M.M.; Adaskaveg, J.E.; Förster, H.; Cambra, M.A.; Duval, H.; et al. Almond Diseases, In *Almonds. Botany, Production and Uses*; Socias-Company, R., Gradziel, T.M., Eds.; CAB International: Boston, MA, USA, 2017; pp. 321-374.
8. Palazón, I.J.; Palazón, C.F. Estudios sobre *Gloeosporium amygdalium* Brizi en los almendros españoles. *Anuario INIA Serv. Prot. Veg.* 1979, 11, 29-43.
9. Peres, N.A.; Timmer, L.W.; Adaskaveg, J.E.; Correl, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis.* 2005, 89, 784-796.

# Almond dieback - Dépérissement de l'amande - Disseccamento del mandorlo *Neoscytalidium dimidiatum*

Le dépérissement de l'amandier causé par *Neoscytalidium dimidiatum* (famille: Botryosphaeriaceae) est une maladie de chancre qui provoque un déclin grave et un dépérissement des amandiers (*Prunus dulcis* (Mill) D. A. Webb) ; le syndrome est répandu en Californie (Nouri et al., 2018); récemment, il a également été signalé dans de nombreux vergers en Tunisie, avec une incidence pouvant aller jusqu'à 20% de plantes affectées.

Les maladies du chancre du tronc et des branches de l'amandier sont une préoccupation majeure pour l'industrie de l'amande dans le monde entier car elles peuvent affecter les jeunes arbres et devenir plus prévalentes à mesure que les vergers vieillissent. Les agents pathogènes des maladies du tronc attaquent généralement les parties ligneuses de l'hôte, provoquant des symptômes tels que des chancre, un dépérissement et des symptômes internes, notamment une nécrose en forme de coin ainsi qu'une décoloration des tissus vasculaires (Gramaje et al., 2012). Parmi certaines des maladies du chancre les plus courantes qui peuvent affecter l'amandier, celles causées par des champignons de la famille des *Botryosphaeriaceae* (English et al., 1966, Olmo et al., 2016). La plupart des espèces de la famille des *Botryosphaeriaceae* ont une distribution mondiale et se produisent sur une grande variété d'hôtes végétaux en tant que saprobes, parasites et endophytes (Slippers et Wingfield, 2007).

## Diagnostic

### Sur le terrain - symptômes et signes

Les symptômes des plantes sont non spécifiques. Ils comprennent la flétrissure des pousses avec flétrissement des feuilles, le flétrissement des branches, le déclin et la mort des arbres. Des coupes transversales des branches d'arbres infectés montrant des nécroses et des décolorations vasculaires brunes sont présentées sur la figure 1.



Figure 1. Dépérissement et flétrissement des branches d'amandiers en Tunisie.

### En laboratoire - isolement, caractéristiques des cultures et identification moléculaire du pathogène

L'isolement du pathogène peut être réalisé directement à partir de tissus nécrotiques. Pour l'isolement, de petits morceaux (4-5 mm) de bois nécrotique doivent être stérilisés en surface

(solution de NaClO à 1% pendant 2 minutes, éthanol à 70% pendant 30 secondes), lavés deux fois à l'eau distillée stérile, placés sur agar d'avoine (OMA) et incubés à 25 °C pendant sept jours. Après incubation, les colonies de *N. dimidiatum* sur OMA sont caractérisées par un mycélium aérien dense et velu qui devient progressivement gris foncé à vert olive. Ce type de colonies produit des arthroconidies ; elles sont généralement brunes foncées, à paroi épaisse, monocellulaires, de 6,3 à 14,2 × 2 à 4,5 µm, et ovales à rectangulaires.

L'identité du pathogène est confirmée par PCR traditionnelle ciblant la région de l'espaceur transcrit interne (ITS1-5.8S-ITS2); l'amplification peut être réalisée en utilisant les amorces ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990).



## Références

1. English, H., Davis, J. R., and De Vay, J. E. 1966. Dothiorella canker, a new disease of almond trees in California. *Phytopathology* 56:146.
2. Gramaje, D., Agustí-Brisach, C., Pérez-Sierra, A., Moralejo, E., Olmo, D., Mostert, L., Damm, U., and Armengol, J. 2012. Fungal trunk pathogens associated with wooddecay of almond trees on Mallorca (Spain). *Persoonia* 28:1-13.
3. Nouri, M.T., Lawrence, D.P., Yagmour, M.A., Michailides, T.J., Trouillas, F.P., 2018. *Neoscytalidium dimidiatum* causing canker, shoot blight and fruit rot of almond in California. *Plant Disease* 102, 1638-1647.
4. Olmo, D., Armengol, J., León, M., and Gramaje, D. 2016. Characterization and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species isolated from almond trees on the Island of Mallorca (Spain). *Plant Dis.* 100:2483-2491
5. Slippers, B., and Wingfield, M. J. 2007. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: Diversity, ecology and impact. *Fungal Biol. Rev.* 21:90-106
6. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics," in *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, eds M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (San Diego, CA: Academic Press Inc), 315-322.

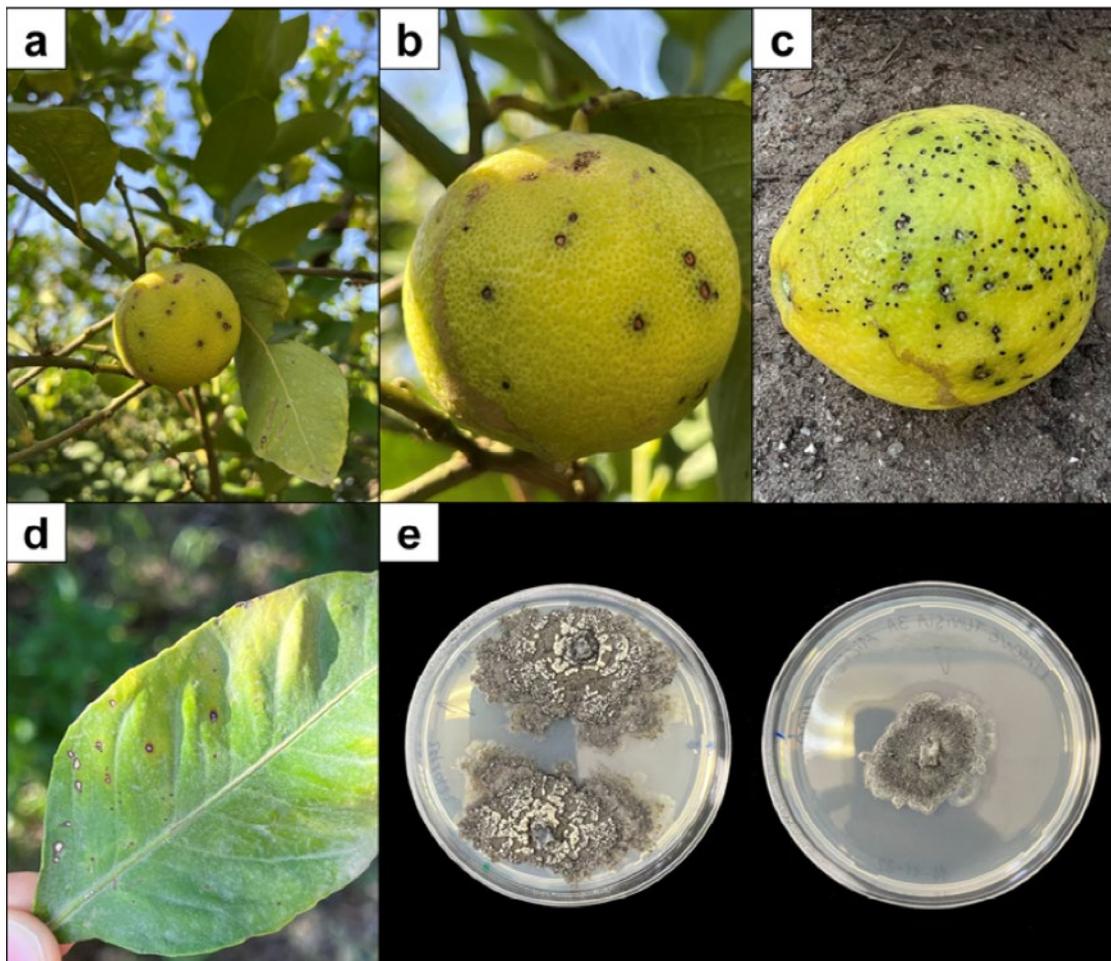
## Citrus Black Spot - Tache noire des agrume - *Macchia nera degli agrumi* *Phyllosticta citricarpa*

La tache noire des agrumes (CBS) est une maladie qui affecte la feuille et la pourriture des fruits de la plupart des espèces d'agrumes (Baldassari et al. 2008; EFSA 2014; EPPO 2020; Kotzé 1981; Paul et al. 2005). Le CBS est présent en Asie, en Australie, en Afrique du Sud et en Amérique du Sud et a récemment été signalé en Tunisie (Boughalleb-M'Hamdi et al. 2020).

L'agent causal de la maladie est *Phyllosticta citricarpa* (téléomorphe: *Guignardia citricarpa*), un agent pathogène de quarantaine figurant à l'annexe II partie A du règlement d'exécution (UE) 2019/20724 de la Commission. Le règlement délégué (UE) 2019/17025 de la Commission a également inscrit *P. citricarpa* comme ravageur prioritaire. Il est inclus dans la liste A de l'OEPP (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes) (EPPO 2020). *Phyllosticta citricarpa* est également un organisme de quarantaine aux États-Unis (Schirmacher et al. 2019).

La propagation du pathogène responsable du CBS se fait par des spores (**Figure 1e**), comprenant à la fois des ascospores transportées par le vent produit dans des pseudothèces (ascocarpes, voir ci-après) et des conidies transportées par l'eau produites dans des pycnidies (voir ci-après) (Guarnaccia et al. 2017).

Les ascospores sont considérées comme la source primaire d'inoculum dans le cycle de la maladie CBS, tandis que les conidies dans l'eau de pluie sont principalement responsables de la dispersion descendante à courte distance du pathogène (Guarnaccia et al., 2017; Spósito et al. 2011). Les cycles d'humidification et de dessiccation alternés des feuilles combinés à des fluctuations de température modérées à chaudes sont des conditions favorables à la maturation des pseudothèces et des ascospores (Fourie et al. 2013; Guarnaccia et al. 2017; Hu et al. 2013).



**Figure 1** a, b et c, taches dures et taches de roussure causées par *Phyllosticta citricarpa* sur la peau de citrons mûrs provenant d'un verger commercial (Tunis, Tunisie) ; d, lésions de taches dures sur les feuilles de citron ; e, cultures sporulantes âgées de sept jours de *Phyllosticta citricarpa* cultivées sur milieu PDA à 25°C

## Diagnostic

### Sur le terrain - symptômes et signes

Le CBS est associé à divers symptômes sur les fruits (Guarnaccia et al. 2019; Kotzé 1981). Les plus courants sont les “taches dures” (**Figure 1a et b**), qui se caractérisent par des lésions nécrotiques enfoncées, de couleur brun pâle avec une bordure rouge foncé et souvent des pycnides (EPPO 2020; Guarnaccia et al. 2017, 2019). D'autres symptômes sont: (i) les taches virulentes, qui sont des lésions nécrotiques enfoncées sans bordure définie, principalement sur les fruits mûrs; (ii) fausse mélanose, qui se compose de petites pustules noires généralement en forme de tache de larme; (iii) taches de rousseur (**Figure 1c**), taches fissurées ou tachetées (Guarnaccia et al. 2019).

Les symptômes sur les feuilles et les rameaux se produisent rarement sur l'orange, la mandarine et d'autres espèces commerciales d'agrumes, mais sont souvent signalés sur les citrons. Ils apparaissent sous forme de petites lésions nécrotiques enfoncées et rondes avec un halo jaune (**Figure 1d**) (Guarnaccia et al. 2019; Kotzé 1981).

La température est un facteur crucial pour le développement de la maladie. Des augmentations rapides de température, généralement de 20° à 27°C, lorsque les fruits sont mûrs, stimulent l'apparition des symptômes de la tache noire des agrumes et conduisent à la formation d'un nombre important de lésions sur les fruits (Guarnaccia et al. 2019; Lee et Huang 1973). Une forte intensité lumineuse peut également faciliter le développement des lésions sur les fruits, de sorte que le côté de la canopée le plus exposé au soleil présente généralement plus de symptômes (Guarnaccia et al. 2019). L'âge avancé et le stress physiologique semblent également favoriser le développement de la tache noire des agrumes (Guarnaccia et al. 2019; Kotzé 1981).

Sur le terrain, un diagnostic précis de *P. citricarpa* est compliqué par le fait que les taches nécrotiques sont des symptômes génériques qui peuvent être causés par d'autres espèces de *Phyllosticta* (Guarnaccia et al. 2019; EFSA 2014; EPPO 2020) et même par d'autres ascomycètes (par exemple *Septoria citri* et *Cytosporina citriperda*).

### En laboratoire - isolement et caractéristiques de cultures

L'isolement des lésions sur les fruits et les feuilles infectées se déroule comme suit. Le matériel végétal infecté doit être désinfecté avec un papier filtre imbibé d'éthanol à 96% ou à 70%. Ensuite, les lésions sont excisées (à l'aide d'un emporte-pièce ou d'un scalpel), transférées sur de l'agar de décoction de cerises (CHA) ou de l'agar extrait de malt chloramphénicolé (MALTCHL), ou de l'agar de pomme de terre dextrose (PDA) amendé de sulfate de streptomycine (250 mg/L) et incubé à 22-23°C pendant 48-72 heures. Après incubation, les hyphes en croissance sont transférés sur des plaques de PDA et laissés à croître à 22-23°C pendant 10-12 jours. Ensuite, les isolats finaux doivent être obtenus par culture monoconidiale.

Sur PDA, les colonies de *P. paracitricarpa* sont plates, assez régulières et à croissance lente, avec un mycélium blanc-grisâtre au départ, devenant progressivement verdâtre à vert foncé, avec des hyphes blancs sur le bord; de plus, elles ont des marges irrégulières bordées d'une zone de mycélium submergé translucide beaucoup plus large et incolore (**Figure 1e**). Le centre de la colonie est sombre avec un mycélium aérien gris à glauque, souvent avec de nombreuses petites touffes. Le revers de la colonie est très sombre au centre et entouré de zones gris sépia et buff (Baayen et al., 2002). Les stromas commencent à se développer après 7-8 jours, tandis que les pycnides matures avec des conidies sont généralement produites dans les 10-14 jours.

En raison des larges similarités morphologiques avec les espèces du genre *Phyllosticta* (par exemple, *Phyllosticta citriasiana*, *Phyllosticta paracapitalensis* et *Phyllosticta paracitricarpa*) (Guarnaccia et al. 2019), l'identification in vitro de *P. citricarpa* ne peut conduire à l'identification précise de l'agent pathogène.

### En laboratoire - détection moléculaire

L'identification de *P. citricarpa* peut être réalisée en séquençant le gène *tefl*, ce qui permet une identification sans ambiguïté de *P. citricarpa* et surtout sa distinction de *P. paracitricarpa* (EPPO, 2020; Guarnaccia et al., 2017).

Récemment, un protocole de PCR en temps réel ciblant une partie du gène *tefl* permet une identification précise de *P. citricarpa* (Zajc et al., 2022).

### Extraction d'ADN

Le prérequis à l'application de la PCR est l'extraction de l'ADN à partir de matériel végétal ou de culture pure. À cette fin, des kits commerciaux peuvent être utilisés.

### PCR conventionnelle et séquençage

Le protocole de PCR conventionnelle pour la détection de *P. citricarpa* cible la région *tefl* qui peut être amplifiée en utilisant les amorces avant EF1-728F - 5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3' et arrière EF2 - 5'-GGA(G/A) GTACCAGT(G/C) ATCATGTT-3' (Guarnaccia et al., 2017). L'amplification de la PCR peut être réalisée en utilisant des kits commerciaux en suivant les instructions du fabricant. L'identification de l'espèce par le produit PCR obtenu doit être réalisée par l'analyse bioinformatique de la séquence correspondante.

### PCR en temps réel

L'un des protocoles de PCR en temps réel les plus prometteurs pour la détection de *P. citricarpa* a été développé par Zajc et al. (2022). La méthode cible une partie du gène *tefl* et se compose de la paire d'amorces Pc-TEFI-F (GAAGGTCAGTTGCCTCACACTTT), Pc-TEFI-R (GTCATATAACCGAGCGCCAAA) et de la sonde TaqMan spécifique Pc-TEFI-Probe (VIC-TTGGCCTCCACTTG-MGBNFQ); cette dernière est marquée d'un rapporteur VIC 5' et d'un liant mineur de sillon non fluorescent (MGB) 3'.

### Gestion

Différentes mesures de contrôle chimique et culturel sont utilisées pour la gestion de la CBS (Guarnaccia et al., 2017). Les plus efficaces comprennent l'application de fongicides pendant la période de sensibilité des fruits. Les principaux fongicides utilisés sont les strobilurines (inhibiteurs de la quinone à l'extérieur, QoI), les dithiocarbamates et le cuivre fixe (activité multisite) et le carbamate de méthylbenzimidazole (Guarnaccia et al., 2017).

En plus du contrôle chimique, des mesures de contrôle culturel, telles que l'élimination de la litière de feuilles avec des machines, l'accélération de la décomposition de la litière de feuilles avec de l'urée, du sulfate d'ammonium, de la bagasse de canne à sucre, le paillage avec des plantes qui poussent entre les rangées de vergers pour couvrir la litière de feuilles, la taille des branches mortes et l'irrigation et la nutrition équilibrées sont couramment utilisées pour réduire la quantité d'inoculum de *P. citricarpa* (Guarnaccia et al., 2017).

### Références

- Baayen RP, Bonants PJM, Verkley G, Carroll GC, van der Aa HA, de Weerd M et al. (2002) Non-pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *Guignardia mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology* 92, 464-477.
- Baldassari RB, Wickert E, De Goes A (2008) Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from Citrus spp. *Eur J Plant Pathol* 120:103-110.
- Boughalleb-M'Hamdi N, Fathallah A, Benfradj N, Ben Mahmoud S, Bel Hadj Ali A, Medhioub L, Jaouadi I, Huber J, Jeandel C, loos R (2020) First report of Citrus Black Spot disease caused by *Phyllosticta citricarpa* on Citrus limon and *C. sinensis* in Tunisia. *New Dis Rep* 41:8
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health) (2014) Scientific Opinion on the risk of *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*) for the EU territory with identification and evaluation of risk reduction options. *EFSA J* 12: 3557.
- EPPO (2020) PM 7/017 (3) *Phyllosticta citricarpa* (formerly *Guignardia citricarpa*). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 50: 440-461. <https://doi.org/10.1111/epp.12700>
- Fourie P, Schutte T, Serfontein S, Swart F (2013) Modeling the effect of temperature and wetness on *Guignardia pseudothecium* maturation and ascospore release in citrus orchards. *Phytopathology* 103(3):281-292. <http://dx.doi.org/101094/PHYTO-07-11-0194>
- Guarnaccia V, Gehrman T, Silva-Junior GJ, Fourie PH, Haridas S, Vu D, Spatafora J, Martin FM, Robert V, Grigoriev IV, Groenewald JZ, Crous PW (2019) *Phyllosticta citricarpa* and sister species of global importance to Citrus. *Mol Plant Pathol* 20(12):1619-1635. <https://doi.org/10.1111/MPP.12861>
- Guarnaccia V, Groenewald JZ, Li H, Glienke C, Carstens E, Hattingh V, Fourie PH, Crous PW (2017) First report of *Phyllosticta citricarpa* and description of two new species, *P. paracapitalensis* and *P. paracitricarpa*, from citrus in Europe. *Stud Mycol* 87:161-185. <https://doi.org/10.1016/J.SIMYCO.2017.05.003>
- Hu J, Johnson EG, Wang NY, Davoglio T, Dewdney MM (2013) qPCR quantification of pathogenic *Guignardia citricarpa* and nonpathogenic *G. mangiferae* in citrus. *Plant* 98(1):112-120. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-13-0465-RE>
- Kotzé JM (1981) Epidemiology and control of Citrus Black Spot in South Africa. *Plant Dis* 65(12):945-950.
- Lee YS and Huang CS (1973) Effect of climatic factors on the development and discharge of ascospores of the citrus black spot fungus. *Journal of Taiwan Agricultural Research* 22, 135-144.
- Paul I, Van Jaarsveld AS, Korsten L, Hattingh V (2005) The potential global geographical distribution of Citrus Black Spot caused by *Guignardia citricarpa* (Kiely): Likelihood of disease establishment in the European Union. *Crop Prot* 24(4):297-308.
- Schirmacher AM, Tomlinson JA, Barnes AV (2019) Species-specific real-time PCR for diagnosis of *Phyllosticta citricarpa* on Citrus species. *EPPO Bull* 49: 306-313.
- Spósito MB, Amorim L, Bassanezi RB, Yamamoto PT, Felipe MR, Czeremainski ABC (2011) Relative importance of inoculum sources of *Guignardia citricarpa* on the Citrus Black Spot epidemic in Brazil. *Crop Prot* 30(12):1546-1552. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2011.08.007>
- Zajc J, Kogej Zwitter Z, Fišer S, Gostinčar C, Vicent A, Domenech AG et al (2023) Highly specific qPCR and amplicon sequencing method for detection of quarantine citrus pathogen *Phyllosticta citricarpa* applicable for air samples. *Plant Path*, 72(3), 548-563.

# Mal secco of citrus - Mal secco des agrumes - Mal secco degli agrumi *Plenodomus tracheiphilus*

Le mal secco des agrumes est une maladie trachéomycotique causée par *Plenodomus tracheiphilus* (anciennement *Phoma tracheiphila*), un fungus mitosporique classé par l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP) comme un ravageur de quarantaine de type A2. À ce jour, le mal secco est présent dans les pays producteurs d'agrumes des régions méditerranéennes et de la mer Noire, à l'exception de l'Espagne, du Portugal et du Maroc (OEPP, 2015). Parmi les espèces d'agrumes touchées, le citron (*Citrus × limon*) est l'hôte principal du pathogène, bien que la maladie soit également courante sur le cédrat, la bergamote, la lime, l'orange amère et le citron rugueux (Nigro et al., 2015). Le pathogène se propage par dispersion de spores (conidies), qui sur le terrain sont produites à l'intérieur de pycnides (voir ci-après) et à partir d'hyphes se développant sur le bois exposé ou les débris, y compris les branches, les feuilles et les fruits. Dans des conditions naturelles, l'inoculum peut être dispersé par le vent et la pluie. Le pathogène peut également être transmis à d'autres arbres par des outils de taille contaminés. Les rameaux et les feuilles qui se trouvent sur le sol sont une source d'inoculum pour l'infection par les racines blessées. Les feuilles infectées par le champignon tombent au sol pendant l'automne et le printemps, et le champignon à l'intérieur du tissu foliaire est capable de sporuler à des températures comprises entre 10 et 25°C (Migheli et al., 2009).

## Diagnostic

### Sur le terrain - symptômes et signes

La maladie du "Mal Secco" induit une large gamme de symptômes spécifiques et non spécifiques qui peuvent apparaître de manière isolée ou simultanée dans la manifestation de la maladie (Migheli et al., 2009) (**Figure 1**).

Le premier symptôme apparaît généralement sur les feuilles des pousses les plus hautes, qui présentent une légère décoloration des nervures primaires et secondaires (**Figure 1i**); ensuite, les feuilles perdent leur éclat, se jaunissent, se flétrissent et tombent, principalement sans les pétioles, qui persistent sur les pousses. Les pousses apparaissent souvent chlorotiques sur la partie apicale tout en conservant une couleur verte normale sur la partie basale (**Figure 1d et e**); parfois, elles deviennent brunes.

Les nouvelles pousses infectées montrent une décoloration jaune ou rose-saumon à rougeâtre du bois, qui se produit également dans le bois des branches principales et secondaires ainsi que dans le tronc, où la croissance du pathogène progresse (**Figure 1g et h**). Avec le temps, la plante subit une dessiccation basipète progressive des pousses, des branches et du tronc, ce qui conduit à la mort de toute la plante (**Figure 1a-c**) (Abbate et al., 2019; Migheli et al., 2009; Nigro et al., 2011; Russo et al., 2020).

En plus de la forme la plus courante de mal secco, deux formes différentes de la maladie peuvent être distinguées: "mal fulminante", une forme fatale rapide de la maladie apparemment due à une infection des racines; et "mal nero", une conséquence d'une infection chronique de l'arbre conduisant à un brunissement du bois de coeur.

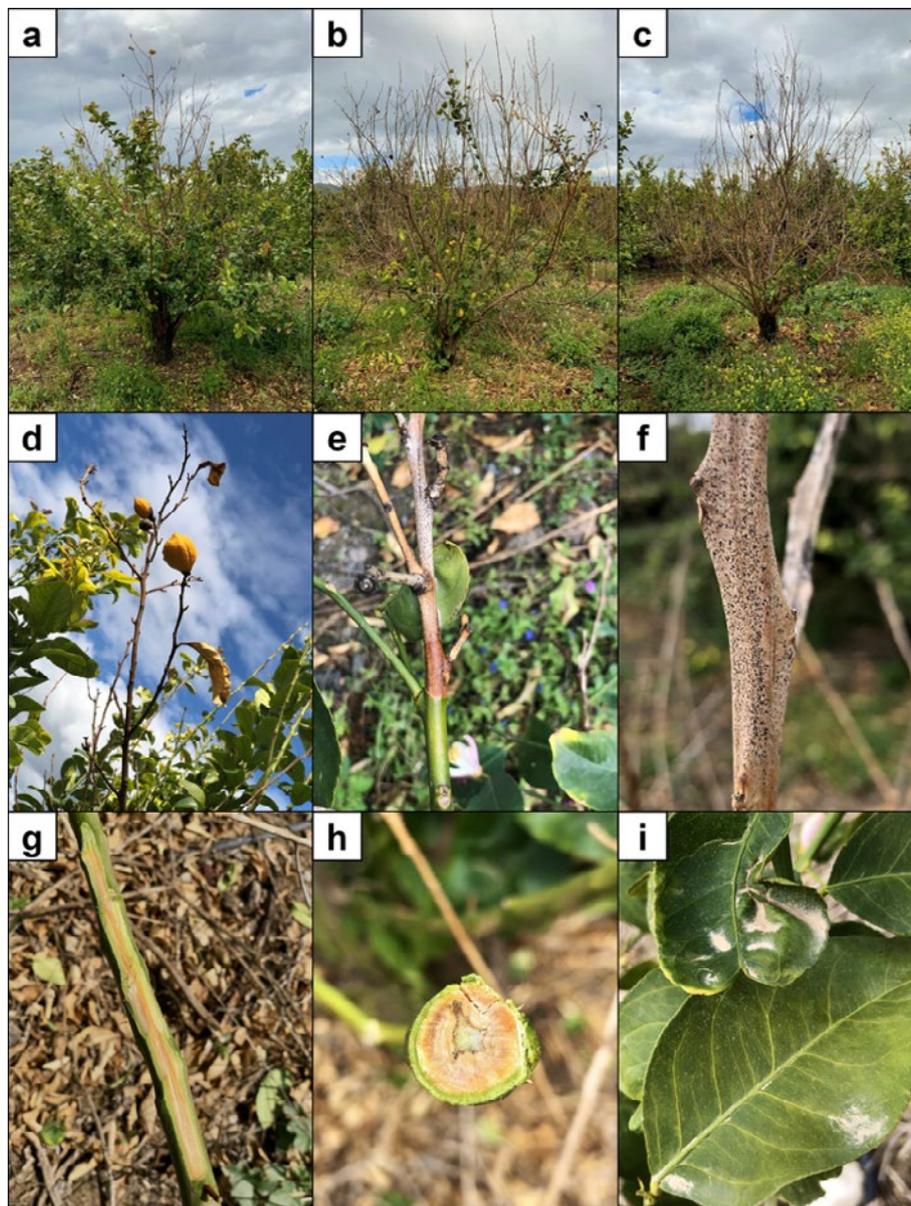
Un autre trait spécifique de la maladie du "Mal Secco" est la présence, à la surface des tissus infectés, de signes du pathogène (Gentile et al., 2000; Migheli et al., 2009). Ceux-ci sont représentés par des pycnides, des structures de longue durée qui peuvent apparaître, à partir de la fin de l'automne, dans des pousses ou des rejets qui ont lentement desséché pendant 1 à 2 ans. Leur présence provoque le détachement de l'épiderme des tissus sous-jacents, suivi de la pénétration de l'air, ce qui se traduit par l'apparition de longues bandes argentées sur les organes affectés (Nigro et al., 2011). La fissuration de l'épiderme permet d'observer les pycnides sous forme de taches noires directement à l'œil nu ou avec une loupe de faible grossissement (Nigro et al., 2011).

### En laboratoire - isolement et caractéristiques de cultures

Le fungus peut être isolé en plaçant des morceaux de tissus infectés prélevés à partir de bois décoloré de pousses vivantes ou de feuilles symptomatiques sur Potato Dextrose Agar (PDA) (OEPP, 2015).

Isolement à partir de pousses symptomatiques : tout d'abord, les pousses sont écorcées ; puis, le tissu xylémique infecté est séparé du reste et découpé en petits morceaux (de 3,0 à 4,0 mm de diamètre); ensuite, une stérilisation de surface du matériel infecté est effectuée par immersion dans une solution de NaOCl à 1 % (1 minute - m), un rinçage dans de l'eau distillée stérilisée (sdw) (1 minute - m), une immersion dans de l'éthanol à 70 % et un dernier rinçage dans de l'eau distillée stérilisée (sdw) (1 minute - m). Les morceaux stérilisés sont séchés avec du papier absorbant, puis disposés sur des plaques de PDA contenant du sulfate de streptomycine (250 mg/L) et incubés à 22-23 °C pendant 48 heures. Après incubation, les hyphes en croissance sont transférés sur des plaques de PDA et laissés à se développer à 22-23 °C pendant 10 à 12 jours. Ensuite, l'isolat final est obtenu par culture monoconidique.

Isolement à partir de feuilles symptomatiques: les nervures des feuilles sont séparées du reste de la lamelle et découpées en petits morceaux (de 2 à 3 mm); puis, les étapes d'isolement suivantes (stérilisation, mise en culture, incubation) sont effectuées comme décrit ci-dessus.



**Figure 1** a, b et c, progression (de gauche à droite) de la gravité du flétrissement et de la défoliation des pousses dans un jeune citronnier affecté par le Mal Secco dans un verger commercial en Sicile (Italie); d et e, chute des feuilles et défoliation des pousses apicales; f, brindille flétrie de citron avec des pycnides dispersées de *P. tracheiphilus*; sections longitudinale (g) et transversale (h) sur une brindille de citron avec la décoloration typique orange-rougeâtre du bois; i, éclaircissement et chlorose des nervures des feuilles dans un citronnier affecté par le Mal Secco.

En culture pure, *Plenodomus tracheiphilus* présente des caractéristiques et des structures particulières. En détail, sur PDA, le pathogène montre un mycélium initialement hyalin, qui devient brun ou rougeâtre rosé après quelques jours. Sur PDA, la température optimale de croissance est de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  et le taux de croissance est de 3,8 à 6,0 mm par jour à cette température. Des variantes chromogènes et non chromogènes ont été distinguées en culture et des isolats présentant des différences de virulence ont été trouvés à l'état naturel (Figure 2) (Magnano di San Lio et al., 1992).

La reproduction asexuée de *P. tracheiphilus* est réalisée par des conidies; celles-ci sont produites soit à l'apex des hyphes conidiogènes (Figure 3) (indiquées sous le nom de phialides; phialoconidies de diamètre  $1,5-3,0 \times 3,0-8,0 \mu\text{m}$ ), soit à l'intérieur de pycnides (Figure 4); ces dernières sont de petites structures de résistance noires et globuleuses présentant une cavité interne recouverte de petites conidies hyalines (diamètre  $0,5-1,5 \times 2,0-4,0 \mu\text{m}$ ) qui sont extrudées à travers des ostioles en cirrhes blanchâtres (OEPP, 2015).

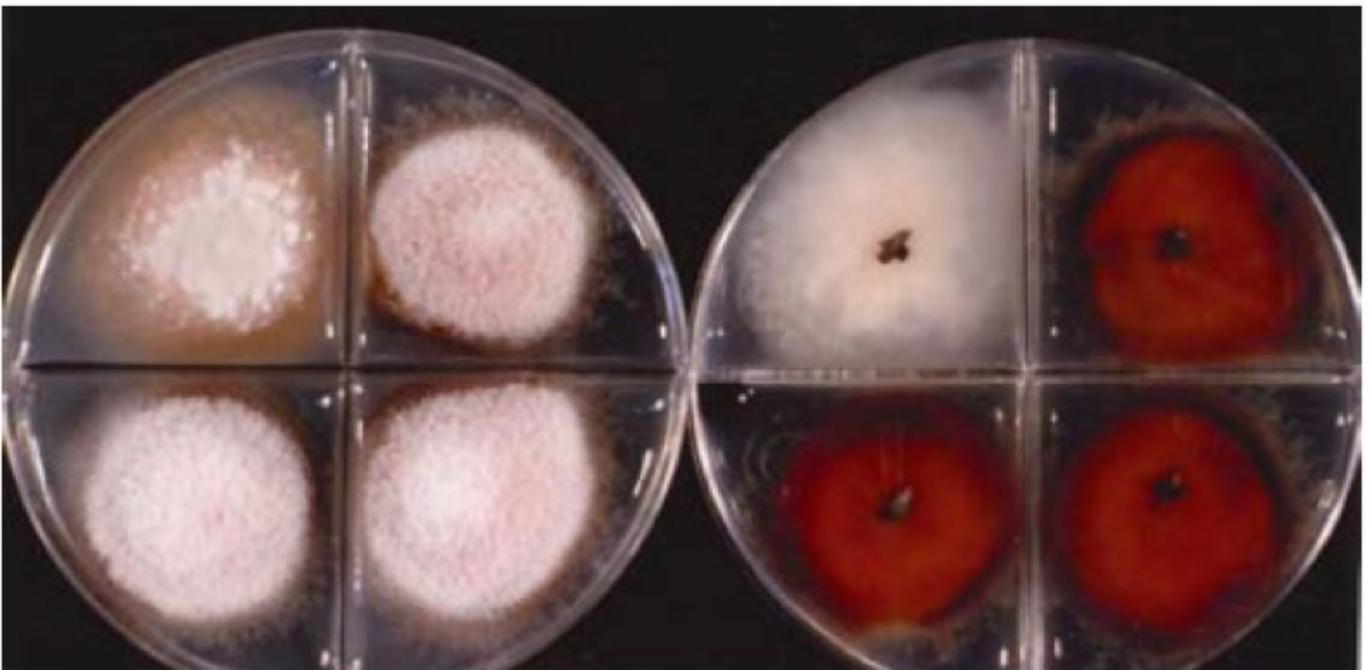
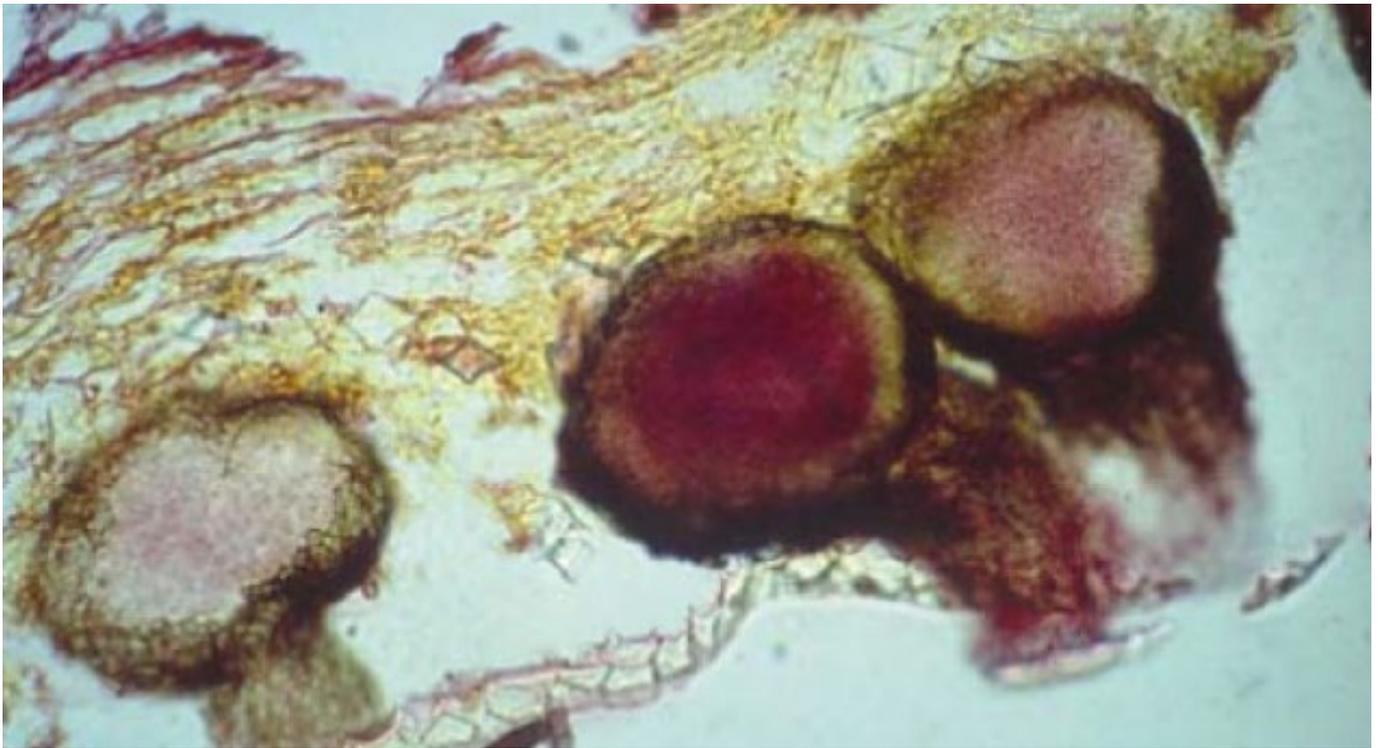


Figure 2 cultures monoconidiales d'une souche chromogène de *P. tracheiphilus*. Le devant et l'arrière de la boîte de Pétri sont présentés à gauche et à droite, respectivement. Notez une variante albino en haut à gauche.



Figure 3 phialoconidies et phialides de *P. tracheiphilus* sur des hyphes libres produits en culture.



**Figure 4** section d'une brindille flétrie de citron montrant des pycnides de *P. tracheiphilus* immergées dans le cortex sous l'épiderme. Notez les cous des pycnides émergeant à travers l'épiderme.

La production de phialides et de phialoconidies peut être observée sur des cultures de 10 à 12 jours cultivées sur PDA, tandis que le développement *in vitro* de pycnides peut être stimulé par une incubation de 12 à 24 heures, en chambre humide, de fragments de brindilles symptomatiques de mal secco (OEPP, 2015).

#### **En laboratoire - détection moléculaire**

À ce jour, les méthodes les plus consolidées pour la détection moléculaire de *P. tracheiphilus* dans des matériaux végétaux suspects, ainsi que pour confirmer l'isolement du pathogène en culture pure, sont toutes basées sur des techniques de PCR (OEPP, 2015).

#### **Extraction d'ADN**

Le prérequis à l'application de la PCR est l'extraction d'ADN à partir de matériel végétal ou de culture pure. À cette fin, des protocoles de laboratoire spécifiques peuvent être suivis (Balmas et al., 2005), ou des kits commerciaux peuvent être utilisés en alternative.

#### **PCR conventionnelle**

Le protocole de PCR conventionnelles suggéré pour la détection de *P. tracheiphilus* a été développé par Balmas et al. (2005). La méthode cible deux régions polymorphes de la région de l'espaceur transcrit interne (ITS) et est basée sur l'utilisation des amorces spécifiques de *P. tracheiphilus* Pt-FOR2: 5'-GGATGGGCGCCAGCCTTC-3' et Pt-REV2: 5'-GCACAAGGGCAGTGGACAAA-3'. L'amplification de la PCR peut être réalisée en utilisant des kits commerciaux en suivant les instructions du fabricant. Les produits de PCR obtenus (le cas échéant) peuvent être séparés sur un gel d'agarose à 1,5 % dans un tampon de migration TAE et visualisés sous lumière UV.

#### **PCR en temps réel**

Le protocole de PCR en temps réel le plus utilisé pour la détection de *P. tracheiphilus* a été développé par Demontis et al. (2008). La méthode cible la région ITS de l'ARNr nucléaire et peut être appliquée en utilisant soit la technologie SYBR® Green I, soit la technologie TaqMan®. Les séquences des amorces et de la sonde sont les suivantes: Phomafor: 5'-GCT GCG TCT GTC TCT TCT GA-3', Phomarev: 5'-GTG TCC TAC AGG CAG GCAA-3', Phomaprobe: 5'-FAM CCA CCA AGG AAA CAA AGG GTC CG BHQ-3'. L'amplification de la PCR peut être réalisée en utilisant des kits commerciaux en suivant les instructions du fabricant. La courbe d'amplification de la PCR est surveillée en temps réel par le système de détection.

## Gestion

À ce jour, aucune méthode unique n'est efficace pour contrôler le mal secco. Les stratégies de contrôle courantes sont basées sur l'application de pratiques agronomiques améliorées, notamment la réduction de l'inoculum fongique par la taille des brindilles et des branches symptomatiques, en particulier les pousses flétries portant des pycnides, et le retrait en temps opportun des drageons de porte-greffe. Des pulvérisations avec des fongicides à base de cuivre autorisés sont également effectuées, en particulier sur les jeunes plants des pépinières (Abbate et al., 2019). Afin de réduire la contamination environnementale par les fongicides, un nouveau polymère superabsorbant (SAP) a été montré pour agir comme réservoir efficace pour la libération contrôlée de cuivre dans le traitement des coupes de taille des brindilles de citron affectées par le mal secco (El boumlasy et al., 2022). D'autres stratégies respectueuses de l'environnement pour la gestion du mal secco ont été poursuivies grâce à l'amélioration génétique du citron (Migheli et al., 2009), basée sur la sélection de génotypes de citron spontanés tolérants à l'infection. En conséquence, sur la côte ionienne de la Sicile (Italie), la variété traditionnelle "Femminello" a été remplacée dans le passé par les cultivars "Monachello" et "Interdonato", deux hybrides spontanés de citron et de cédrat. Cette dernière espèce est très résistante mais produit des fruits de qualité inférieure et une récolte réduite (Catalano et al., 2021; Migheli et al., 2009).



## Références

- Abbate L, Mercati F, Fatta Del Bosco S (2019) An overview on citrus Mal Secco disease: approaches and strategies to select tolerant genotypes in *C. limon*. *Crop Breed Genet Genom* 1:e190018. <https://doi.org/10.20900/cbagg20190018>
- Balmas V, Scherm B, Ghignone S, Salem AOM, Cacciola SO & Migheli Q (2005) Characterization of *Phoma tracheiphila* by RAPDPCR, microsatellite-primed PCR and ITS rDNA sequencing and development of specific primers for in planta PCR detection. *Eur J Plant Pathol* 111, 235–247.
- Demontis MA, Cacciola SO, Orru M, Balmas VC, Maserti E, Mascia L et al. (2008) Development of real-time PCR based on SYBR® Green I and TaqMan® technologies for specific quantitative detection of *Phoma tracheiphila* in infected Citrus. *Eur J Plant Pathol* 120, 339–351.
- El Boumlasy S, La Spada F, Pane A, Licciardello A, Debdoubi A, Tuccitto N, Cacciola SO, (2022) A super absorbent polymer containing copper to control *Plenodomus tracheiphilus* the causative agent of Mal Secco disease of lemon. *Front Microbiol* 13:987056. doi:10.3389/fmicb.2022.987056
- EPPO (2015) PM7/048 (3) *Plenodomus tracheiphilus* (formerly *Phoma tracheiphila*). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 46: 183-192. <https://doi.org/10.1111/epp.12218>
- Gentile A, Deng ZN, Tribulato E, Albanese GR (2000) Evaluation of lemon somaclones for tolerance to Mal Secco disease by artificial inoculation. *Acta Hort* 535(535):259-263. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2000.535.32>
- Magnano di San Lio G, Cacciola SO, Pane A & Grasso S (1992) Relationship between xylem colonization and symptom expression in mal secco infected sour orange seedlings. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 2, 873–876.
- Migheli Q, Cacciola SO, Balmas V, Pane A, Ezra D, Magnano di San Lio G (2009) Mal Secco disease caused by *Phoma tracheiphila*: A potential threat to lemon production worldwide. *Plant Dis* 93(9):852–867.
- Nigro F, Ippolito A, Salerno MG (2011) Mal Secco disease of citrus: A Journey through a century of research. *J Plant Pathol* 193(3):523–560.
- Nigro F, Ippolito A, Salerno MG (2015) Searching for citrus rootstocks resistant to Mal Secco disease: A review. *Acta Hort* 1065:987–992.
- Russo R, Caruso M, Arlotta C, Lo Piero AR, Nicolosi E, Di Silvestro S (2020) Identification of field tolerance and resistance to Mal Secco disease in a citrus germplasm collection in Sicily. *Agron* 10(11):1806. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY10111806>

## Olive tree dieback - Dépérissement de l'olivier - Deperimento dell'olivo *Pleurostoma richardsiae*

Le dépérissement de l'olivier par *Pleurostoma richardsiae* (famille des Pleurostomataceae) est un déclin généralisé de l'olivier européen à feuilles persistantes (*Olea europaea* L.) signalé au Brésil, en Croatie et en Italie (Canale et al., 2019, Carlucci et al., 2013, Ivic et al., 2018); récemment, ce syndrome a également été signalé dans le nord et le centre de la Tunisie.

Le syndrome est caractérisé par un brunissement foliaire et la chute des feuilles, le flétrissement des pousses apicales, la mort des rameaux et des branches, et des stries brunes sous l'écorce du tronc, des branches et des rameaux.

### Diagnostic

#### Sur le terrain - symptômes et signes

Les symptômes des plantes sont non spécifiques. Le syndrome commence par un brunissement foliaire et la chute des feuilles, le flétrissement des pousses apicales, la mort des rameaux et des branches, et des stries brunes sous l'écorce du tronc, des branches et des rameaux similaires à celles produites par le flétrissement verticillien (Canale et al., 2019; Carlucci et al., 2013) (**Figure 1**). Ensuite, les décolorations de l'écorce évoluent en chancres.



**Figure 1** Caractéristiques des symptômes de dépérissement associés à des champignons pathogènes chez les oliviers en Tunisie. Symptômes graves de dépérissement des rameaux de l'olivier et décoloration du bois évoluant en chancres.

#### En laboratoire - isolement, caractéristiques des cultures et identification moléculaire du pathogène

L'isolement du pathogène peut être effectué directement à partir de tissus nécrotiques. Pour l'isolement, de petits morceaux (4-5 mm) de bois nécrotique doivent être stérilisés en surface (solution de NaClO à 1 % pendant 2 minutes, éthanol à 70 % pendant 30 secondes), lavés deux fois à l'eau distillée stérile, semés sur de l'agar d'avoine (OMA) et incubés à 25 °C pendant 21 jours.

Après l'incubation, les colonies de *Pleurostoma richardsiae* sur OMA sont caractérisées par une apparence cotonneuse blanche à blanc cassé au centre, avec des hyphes aériennes diminuées s'étendant jusqu'à la marge de la colonie grise et légèrement irrégulière. Ce type de colonies produit des conidies sub-globuleuses épaisses et à paroi brun et des phialides.

L'identité du pathogène est confirmée par PCR traditionnelle ciblant la région de l'espaceur transcrit interne (ITS1-5.8S-ITS2) et une partie de la  $\beta$ -tubuline (BT2) ; les amplifications des deux gènes peuvent être réalisées en utilisant les amorces ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) et T1 (5'-AACATGCCTGAGATTGTAAGT-3') (O'Donnell et al., 1997) / Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (Glass et al., 1995), respectivement.



## Références

1. Carlucci, A., Raimondo, M., Cibelli, F., Phillips, A., and Lops, F. 2013. *Pleurostomophora richardsiae*, *Neofusicoccum parvum* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with a decline of olives in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*. 52:517-527.
2. Canale, M. C., Nunes Nesi, C., Falkenbach, B. R., Hunhoff Da Silva, C. A., and Brugnara, E. C. 2019. *Pleurostomophora richardsiae* associated with olive tree and grapevine decline in southern Brazil. *Phytopathologia Mediterranea*. 58:201-205.
3. Glass, N.L., Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied Environmental Microbiology*. 61:1323-1330.
4. Ivic, D., Tomic, Z., & Godena, S. 2018. First report of *Pleurostomophora richardsiae* causing branch dieback and collar rot of olive in Istria, Croatia. *Plant Disease*. 102(12), 2648-2648.
5. O'Donnell K, Cigelnik E. 1997. Two different intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 7:103-116.
6. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics," in *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, eds M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (San Diego, CA: Academic Press Inc), 315-322.

# Informations Générales sur PROMETEO

## Bénéficiaire principal

Università degli Studi di Catania (UNICT)

## Partenaires

**P2:** Université de Tunis El Manar (UTM)

**P3:** Centre Technique des Agrumes (CTA)

**P4:** Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT)

**P5:** Agence Nationale de Promotion de la Recherche scientifique (ANPR)

**P6:** Comune di Palazzolo Acreide (PALAZZOLO)

**P7:** Centro di Ricerca per l'Innovazione e Diffusione della conoscenza (CERID)

**P8:** Expergreen S.R.L. (EXPERGREEN)

## LE PROJET PROMETEO EN CHIFFRES

Durée	<b>24 mois</b>
Début	<b>29/10/2021</b>
Fin	<b>28/10/2023</b>
N. Partenaires	<b>8</b>
Budget total	<b>1.459.103,08 €</b>
Contribution UE	<b>1.291.659,13 €</b>

## LES ACTIVITÉS DU PROJET PROMETEO

No. événements de diffusion et Atelier thématique organisés	<b>5</b>
Nombre de participants	<b>450+</b>
Site-web du projet	<b>1</b>
Compte social-média	<b>4</b>

## CONTACTS

**Site du projet:** <https://www.prometeo-italietunisie.eu>

**Adresse e-mail de référence:** [info@prometeo-italietunisie.eu](mailto:info@prometeo-italietunisie.eu)

**Facebook:** <https://www.facebook.com/Prometeo.ItalieTunisie>

**Instagram:** [https://www.instagram.com/prometeo\\_italietunisie/](https://www.instagram.com/prometeo_italietunisie/)

**Twitter:** [https://twitter.com/prometeo\\_ItaTun](https://twitter.com/prometeo_ItaTun)

**Youtube:** <https://www.youtube.com/@prometeoitalietunisie4919>



Ce document a été créé et maintenu avec le soutien financier de l'Union Européenne dans le cadre du Programme IEV de Coopération Transfrontalière "Italie Tunisie" 2014-2020. Son contenu relève de la seule responsabilité de CERID et ne reflète pas nécessairement les opinions de l'Union européenne et/ou celles de l'Autorité de Gestion.