

République Algérienne Démocratique et Populaire
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ecole Nationale Supérieure Agronomique
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة
(ENSA) El Harrach – Alger



Thèse de DOCTORAT

Présentée par : Naouel GHIAT

En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Sciences Agronomiques
Spécialité : Phytopathologie

THEME

Diversité génotypique et phénotypique des *Phoma* spp. et espèces apparentées pathogènes sur les *Fabaceae* : évaluation de la pathogénicité et de la gamme d'hôte - Cas du bersim (*Trifolium alexandrinum* L.)

Devant le jury :

M. Lakhdar KHELIFI	Professeur (ENSA) El Harrach, Alger	Président
M. Zouaoui BOUZNAD	Professeur (ENSA) El Harrach	Directeur de thèse
M. Alessandro INFANTINO	Professeur (CREA-DC) Italie	Co-directeur de thèse
Mme. Houda BOUREGHDA	Professeur (ENSA) El Harrach	Examinatrice
Mme. Saïda MESSGO-MOUMENE	Professeur (Université de Blida)	Examinatrice
M. Benali SETTI	Professeur (Université de Chlef)	Examineur
M. Christophe LE MAY	Maitre de conférences (Institut Agro Rennes-Angers)	Membre invité

Année universitaire 2025-2026

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	I
REMERCIEMENTS	II
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	XI
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES TABLEAUX	XV
LISTE DES ABREVIATIONS	XVI
INTRODUCTION	1
1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1.1. Intérêts et importance des <i>Fabaceae</i>	4
1.1.1. Intérêt agronomique	4
1.1.2. Intérêt nutritionnel et médicinal	4
1.1.3. Importance économique des <i>Fabaceae</i> dans le monde et en Algérie	5
1.2. Origine, taxonomie et phylogénie des <i>Fabaceae</i>	6
1.2.1. Origine des <i>Fabaceae</i>	6
1.2.2. Taxonomie et phylogénie des <i>Fabaceae</i>	6
1.3. Cas du trèfle d'Alexandrie	9
1.3.1. Origine, distribution et importance du trèfle d'Alexandrie	9
1.3.2. Contraintes biotiques de la culture du trèfle d'Alexandrie	10
1.4. Le genre <i>Phoma</i> et les espèces apparentées inféodées aux <i>Fabaceae</i>	11
1.4.1. Caractéristiques morphologiques	11
1.4.2. Evolution de leur taxonomie	13
1.4.3. Taxonomie actuelle	15
1.5. Les anthracnoses et les pourritures racinaires des <i>Fabaceae</i> causées par <i>Phoma</i> spp. et les espèces apparentées	16
1.5.1. Symptômes des anthracnoses et des pourritures racinaires	16
1.5.2. Cycle de développement	17
1.5.3. Principales <i>Phoma</i> spp. et espèces apparentées responsables de ces maladies	19
1.5.4. Gamme d'hôte et spécificité parasitaire	21

1.6. Diversité de <i>Phoma</i> et des genres apparentés responsables des anthracnoses et des pourritures racinaires des <i>Fabaceae</i>	22
1.6.1. Variabilité morphologique et culturale	22
1.6.2. Variabilité de la pathogénicité selon les organes de la plante	23
1.6.3. Diversité génotypique	23
1.7. Stratégies de lutte contre les maladies causées par <i>Phoma</i> et les espèces apparentées	25
1.7.1. Pratiques culturales	25
1.7.2. Fongicides	26
1.7.3. Résistance variétale	27
1.7.4. Agents antagonistes fongiques et bactériens	27
2. MATERIELS ET METHODES	
2.1. Prospection et récolte des échantillons	29
2.2. Isolement, purification et conservation des isolats	30
2.3. Identification et diversité génotypique des isolats	31
2.3.1. Extraction et estimation quantitative et qualitative de l'ADN génomique	31
2.3.2. Identification moléculaire des isolats	31
2.3.2.1. Amplification des régions ITS, LSU et des gènes <i>tub2</i> , <i>rpb2</i>	32
2.3.2.2. Séquençage multi-locus des régions ITS, LSU, et des gènes <i>tub2</i> , <i>rpb2</i>	32
2.3.2.3. Alignement et construction de l'arbre phylogénétique	33
2.3.3. Evaluation de la diversité génétique et de la structure des populations des isolats étudiés	34
2.3.3.1. Analyse de la diversité nucléotidique avec le logiciel DnaSp	34
2.3.3.2. Analyse des haplotypes et cartographie des réseaux	35
2.4. Caractérisation culturale et morphologique des isolats	35
2.4.1. Description des caractères cultureux des isolats sur différents milieux de culture	35
2.4.2. Description et mensuration des structures morphologiques des isolats	36
2.5. Evaluation de la pathogénicité et de la spécificité parasitaire des espèces fongiques étudiées	36
2.5.1. Choix des espèces et des isolats fongiques	36
2.5.2. Choix des espèces hôtes	37
2.5.3. Production de l'inoculum, méthodes d'inoculation et conditions d'incubation	37

2.5.4. Dispositif expérimental	38
2.5.5. Notation des symptômes selon les organes et expression des résultats	40
2.5.6. Validation des postulats de Koch concernant les inoculations	41
2.6. Analyses statistiques	41
3. RESULTATS	
3.1. Description des différents types de symptômes causés par les <i>Phoma</i> spp. et les espèces apparentées, observés sur les <i>Fabaceae</i> lors des prospections	43
3.1.1. Symptômes observés sur le bersim (<i>Trifolium alexandrinum</i> L.).....	43
3.1.2. Symptômes observés sur la luzerne (<i>Medicago sativa</i> L.)	43
3.1.3. Symptômes observés sur le pois (<i>Pisum sativum</i> L.)	45
3.1.4. Symptômes observés sur la fève (<i>Vicia faba</i> L.)	45
3.1.5. Symptômes observés sur le pois chiche (<i>Cicer arietinum</i> L.)	45
3.2. Identification génotypique des isolats et étude de leurs relations phylogénétiques	46
3.2.1. Pureté et dosage des extraits d'ADN obtenus pour les isolats étudiés	46
3.2.2. Taille et qualité des fragments des régions amplifiés ITS, LSU et des gènes <i>tub2</i> et <i>rpb2</i>	46
3.2.3. Analyse comparative des séquences et des degrés de similarité des isolats étudiés avec les espèces de références (données NCBI)	47
3.2.4. Présentation de l'arbre phylogénétique des espèces fongiques obtenues et diversité inter- et intraspécifique des isolats étudiés	50
3.2.5. Identification des isolats par analyse phylogénétique multilocus	56
3.2.6. Analyse de la diversité nucléotidique (polymorphisme) et différenciation génotypique des isolats	57
3.2.7. Cartographie des réseaux d'haplotypes et structure des populations d' <i>A. nigripyncnidia</i> et de <i>D. pinodella</i>	63
3.3. Caractérisation phénotypique des <i>Phoma</i> spp. et espèces apparentées identifiées	67
3.3.1. Principales espèces identifiées : taxonomie et caractères morpho-culturels	67
3.3.1.1. Espèces fongiques associées à la luzerne	67
3.3.1.2. Espèces fongiques associées au trèfle	72
3.3.1.3. Espèces fongiques associées au pois	74
3.3.1.4. Espèce fongique associée à la fève	78
3.3.1.5. Espèces fongiques associées au pois chiche	80

3.3.2. Croissance mycélienne et aspect cultural des isolats	
sur les milieux de culture Mathur, V8, Malt et PDA	80
3.3.3. Pathogénicité et spécificité des genres et espèces fongiques identifiées	83
3.3.3.1. Pathogénicité et spécificité des quatorze espèces fongiques	
identifiées sur les principales <i>Fabaceae</i> alimentaires et fourragères	83
3.3.3.1.1. Incidence de la maladie sur les différents organes de <i>Fabaceae</i>	83
3.3.3.1.2. Sévérité de la maladie sur les différents organes de <i>Fabaceae</i>	90
3.3.3.1.3. Spécificité parasitaire et gamme d'hôte des espèces fongiques	
identifiées	93
3.3.3.2. Pathogénicité et gamme d'hôte chez les pathosystèmes bersim/espèces :	
<i>A. nigripyncnidia</i> , <i>D. pinodella</i> et <i>B. exigua</i> au niveau des différents organes	
de la plante	95
3.3.3.2.1. Incidence de la maladie sur les différents organes des plantes inoculées	96
3.3.3.2.2. Sévérité des attaques sur les différents organes des plantes inoculées	98
3.3.3.2.3. Spécificité parasites et gamme d'hôte des isolats d' <i>A. nigripyncnidia</i> ,	
de <i>D. pinodella</i> et de <i>B. exigua</i>	102
4. DISCUSSIONS	
4.1. Diversité des symptômes causés par les <i>Phoma</i> spp. et espèces apparentées	105
4.2. Diversité génétique des <i>Phoma</i> spp. et espèces apparentées	
et leurs relations phylogénétiques	107
4.3. Variabilité morpho-culturale des espèces de <i>Phoma</i> identifiées	
et espèces apparentées	112
4.4. Variabilité de la pathogénicité et de la spécificité des espèces identifiées sur	
la gamme de <i>Fabaceae</i>	115
4.5. Pathogénicité et spécificité parasitaire chez le pathosystème bersim/espèces	
<i>A. nigripyncnidia</i> , <i>D. pinodella</i> et <i>B. exigua</i> au niveau des différents organes	
des <i>Fabaceae</i>	121
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHES	126
6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	131
ANNEXES	
ARTICLE SCIENTIFIQUE	
RESUME	
ABSTRACT	
ملخص	

RESUME

Les *Phoma* spp. et espèces apparentées constituent un complexe important d'agents phytopathogènes responsables des anthracnoses et des pourritures racinaires des *Fabaceae*. Leur identification demeure difficile en raison de la forte similitude morphologique entre les espèces et d'une spécificité parasitaire complexe. A cet effet, plusieurs objectifs ont été étudiés : (1) inventorier et caractériser les *Phoma* spp. et les espèces apparentées associées aux cultures des Fabacées alimentaires et fourragères en Algérie, avec un intérêt particulier pour le bersim, (2) évaluer la diversité génétique inter- et intraspécifique des populations fongiques identifiées, (3) caractériser par marqueurs phénotypique les espèces fongiques identifiées et évaluer leur pathogénicité. L'approche multilocus, basée sur l'analyse phylogénétiques des régions ITS, LSU et des gènes *tub2* et *rpb2* a permis d'identifier 5 genres : *Phoma*, *Ascochyta*, *Didymella*, *Nothophoma* et *Boeremia* et 14 espèces au sein de la famille des *Didymellaceae*. Parmi celles-ci, on peut citer *P. herbarum*, *A. nigripyncnidia*, *A. syringae*, *D. lethalis*, *B. exigua* et *N. pruni* isolées du pois, de la luzerne et du bersim, observées pour la première fois en Algérie. L'analyse du polymorphisme nucléotidique par DnaSP a mis en évidence une diversité génétique contrastée entre les espèces étudiées. Les isolats d'*A. medicaginicola* et *D. pinodella* ont présenté les niveaux de diversité les plus élevés, traduisant une importante variabilité interspécifique, tandis que ceux d'*A. nigripyncnidia*, ont montré une faible diversité génétique suggérant une structure plus homogène. Par ailleurs, les analyses haplotypiques et la construction des réseaux réalisées par PopArt, sur *D. pinodella* et *A. nigripyncnidia* isolées du bersim ont révélé des structures génétiques distinctes. L'espèce *D. pinodella* présente un haplotype dominant largement distribué à l'échelle mondiale (Algérie, Asie, Europe), alors qu'*A. nigripyncnidia* montre une diversité géographique plus marquée et un flux génétique limité. Sur le plan morphologique et cultural, une variabilité importante entre les espèces étudiées est constatée. La concordance globale entre les données morphologiques et phylogénétiques confirme l'intérêt d'une approche polyphasique pour l'identification des espèces appartenant aux *Didymellaceae*. Les essais de pathogénicité révèlent une forte variabilité des capacités infectieuses des 14 espèces sur les *Fabaceae*. Les espèces *D. pinodella*, *D. pinodes* et *A. medicaginicola* se distinguent par une forte agressivité, avec une capacité d'infection à la fois sur les organes aériens et souterrains. Par contre, les espèces *D. pisi*, *D. fabae*, *A. nigripyncnidia*, *D. lethalis*, et *P. rabiei* présentent une agressivité intermédiaire et variable avec une spécificité plus marquée selon l'hôte ou l'organe. En revanche, *B. exigua*, *A. syringae*, *P. herbarum* et *N. pruni* montrent une faible pathogénicité et un spectre d'hôtes restreint. Ces résultats mettent en évidence une pathogénicité dominée par des espèces polyphages et fortement agressives dans les infections des organes aériens et souterrains. Le pathosystème bersim et les trois espèces *A. nigripyncnidia*, *D. pinodella* et *B. exigua* a révélé une variabilité importante de l'agressivité et de la spécialisation d'hôte entre les espèces étudiées. En particulier, *D. pinodella* et *A. nigripyncnidia* se sont montrées les plus agressives avec une grande capacité à infecter les parties souterraines. À l'inverse, *B. exigua* a montré une pathogénicité plus faible et un spectre d'hôtes plus restreint.

Mots clés: *Didymellaceae*, phylogénie multilocus, pathogénicité, *Fabaceae*

ABSTRACT

Phoma spp. and related species constitute a major complex of plant pathogens responsible for anthracnose and root rot in *Fabaceae*. Their identification remains difficult due to the high morphological similarity between species and the complex host specificity. For this purpose, several objectives were investigated: (1) to inventory and characterise *Phoma* spp. and related species associated with food and fodder *Fabaceae* crops in Algeria, with a particular focus on bersim, (2) to assess the inter- and intraspecific genetic diversity of the identified fungal populations, (3) to characterise the identified fungal species using phenotypic markers and assess their pathogenicity. The multilocus approach, based on phylogenetic analysis of the ITS and LSU regions and the *tub2* and *rpb2* genes, identified five genera : *Phoma*, *Ascochyta*, *Didymella*, *Nothophoma*, *Boeremia*, and 14 species within the family *Didymellaceae*. These include *P. herbarum*, *A. nigripyncnidia*, *A. syringae*, *D. lethalis*, *B. exigua* and *N. pruni*, which were isolated from pea, alfalfa and bersim and observed for the first time in Algeria. Analysis of nucleotide polymorphism using DnaSP revealed genetic diversity among the species studied. *A. medicaginicola* and *D. pinodella* isolates exhibited the highest levels of diversity, reflecting significant interspecific variability, whilst those of *A. nigripyncnidia* showed low genetic diversity, suggesting a more homogeneous structure. Furthermore, haplotype analyses and network construction carried out using PopArt on *D. pinodella* and *A. nigripyncnidia* isolated from bersim revealed distinct genetic structures. *D. pinodella* exhibits a dominant haplotype that is widely distributed globally (Algeria, Asia, Europe), whereas *A. nigripyncnidia* shows greater geographical diversity and limited gene flow. In terms of morphology and cultural characteristics, significant variation was observed among the species studied. Overall agreement between the morphological and phylogenetic data confirmed the value of a multi-phase approach for identifying species belonging to the *Didymellaceae*. Pathogenicity tests reveal considerable variation in the infectivity of the 14 species on *Fabaceae*. The species *D. pinodella*, *D. pinodes* and *A. medicaginicola* are characterised by high virulence, with the ability to infect both above and below ground parts. In contrast, the species *D. pisi*, *D. fabae*, *A. nigripyncnidia*, *D. lethalis*, and *P. rabiei* exhibit intermediate and variable levels of virulence, with a more pronounced specialization depending on the host or organ. Conversely, *B. exigua*, *A. syringae*, *P. herbarum* and *N. pruni* exhibit low pathogenicity and a limited host range. These results highlight that pathogenicity is dominated by polyphagous and highly aggressive species in infections of both above and below ground parts of the plant. The bersim pathosystem and the pathogens, *D. pinodella* and *A. nigripyncnidia* proved the most aggressive, the latter showing a notable capacity to infect underground parts, whilst *B. exigua* exhibited lower pathogenicity and a more limited host range.

Keywords: *Didymellaceae*, multilocus phylogeny; pathogenicity; *Fabaceae*.

ملخص

تُشكّل أنواع فطر *Phoma* والأنواع ذات الصلة مجموعةً كبيرةً من العوامل الممرضة للنباتات المسؤولة عن مرض الأنثراكنوز وتعفن الجذور في الفصيلة البقولية. ولا يزال تحديدها صعبًا نظرًا للتشابه المورفولوجي الكبير بين الأنواع وتخصصها الطفيلي المعقد. ولتحقيق هذه الغاية، دُرست عدة أهداف: (1) حصر وتوصيف أنواع فطر *Phoma* والأنواع ذات الصلة المرتبطة بمحاصيل الفصيلة البقولية الغذائية والعلفية في الجزائر، مع التركيز بشكل خاص على البرسيم؛ (2) تقييم التنوع الجيني بين الأنواع وداخلها في التجمعات الفطرية المحددة؛ (3) توصيف الأنواع الفطرية المحددة باستخدام المؤشرات الظاهرية وتقييم قدرتها على إحداث المرض. وقد حددت الدراسة متعددة المواقع القائمة على التحليل الوراثي لمناطق ITS و LSU وجينات *tub2* و *rpb2*، خمسة أجناس: *Phoma* و *Ascochyta* و *Didymella* و *Boeremia* و *Notophoma*، و14 نوعًا ضمن عائلة *Didymellaceae*. من بين هذه الأنواع، غُزلت أنواع *P. herbarum* و *A. nigripyncnidia* و *A. syringae* و *D. lethalis* و *B. exigua* و *N. pruni* من الحمص، البازلاء، الفول، الفصة، البرسيم، ولوحظت لأول مرة في الجزائر. كشف تحليل تعدد أشكال النيوكليوتيدات باستخدام برنامج DnaSP عن تنوع جيني بين الأنواع المدروسة. أظهرت عزلات *A. medicaginicola* و *D. pinodella* أعلى مستويات التنوع، مما يعكس تباينًا كبيرًا بين الأنواع، بينما أظهرت عزلات *A. nigripyncnidia* تنوعًا جينيًا منخفضًا، مما يشير إلى بنية أكثر تجانسًا. علاوة على ذلك، كشفت تحليلات النمط الفردي وبناء الشبكة التي أجراها برنامج PopArt على *D. pinodella* و *A. nigripyncnidia* المعزولتين من البرسيم عن بنى جينية متميزة. يُظهر *D. pinodella* نمطًا فرديًا سائدًا واسع الانتشار عالميًا (الجزائر، آسيا، أوروبا)، بينما يُظهر *A. nigripyncnidia* تنوعًا جغرافيًا أكبر وتدفقًا جينيًا محدودًا. لوحظ تباين كبير بين الأنواع المدروسة من الناحيتين المورفولوجية والثقافية. وقد أكد التوافق العام بين البيانات المورفولوجية والوراثية أهمية اتباع نهج متعدد الأوجه لتحديد الأنواع التابعة لفصيلة *Didymellaceae*. وكشفت اختبارات الإراضية عن تباين كبير في قدرة الأنواع الأربعة عشر على إصابة نباتات الفصيلة البقولية. وتتميز الأنواع *D. pinodella* و *D. pinodes* و *A. medicaginicola* بشراستها العالية، وقدرتها على إصابة كل من الأجزاء الهوائية والأرضية. في المقابل، تُظهر الأنواع *D. pisi* و *D. fabae* و *A. nigripyncnidia* و *D. lethalis* و *P. rabiei* شراسة متوسطة ومتغيرة، مع تخصص أكثر وضوحًا اعتمادًا على العائل أو العضو. وعلى النقيض من ذلك، تُظهر الأنواع *B. exigua* و *A. syringae* و *P. herbarum* و *N. pruni* مرضية منخفضة ونطاقًا عائليًا محدودًا. تُبرز هذه النتائج هيمنة الأنواع متعددة التغذية شديدة العدوانية على قدرة الفطريات على إحداث المرض في إصابة الأجزاء الهوائية والجوفية من النبات. وقد كشف نظام الإصابة في نبات البرسيم، والأنواع الثلاثة *A. nigripyncnidia* و *D. pinodella* و *B. exigua*، عن تباين كبير في العدوانية والتخصص في العائل بين الأنواع المدروسة. وعلى وجه الخصوص، أثبتت *D. pinodella* و *A. nigripyncnidia* أنهما الأكثر عدوانية، حيث أظهر الأخير قدرة عالية على إصابة الأجزاء الجوفية. في المقابل، أظهر *B. exigua* قدرة أقل على إحداث المرض ونطاقًا عائليًا أكثر محدودية.

الكلمات المفتاحية: بقوليات، التنوع المرضي، التحليل الجيني متعدد المواقع، *Didymellaceae*