

THESE DE DOCTORAT D'ETAT
PRESENTEE A L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE PARIS 6

Par

Zouaoui BOUZNAD

Chargé de cours à l' I.N.A. (Alger)

Pour obtenir le grade de Docteur es-Sciences Naturelles
Spécialité : Phytopathologie

Sujet :

CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DU GENRE *Ascochyta*
CAS PARTICULIER DE L'ETUDE BIOLOGIQUE,
ULTRASTRUCTURALE ET CYTOCHIMIQUE DES RELATIONS
HOTE-PARASITE CHEZ LE COUPLE
Pisum sativum L. / Ascochyta pisi Lib.

Soutenue le 30 mai 1989 devant la Commission d'examen :

Président : Mme A. NOUGAREDE
Rapporteurs : Mr G. BOMPEIX
Mr C. ALLARD
Mme M.F. ROQUEBERT
Examineurs : Mr A. COLENO
Mr G. SALLE
Mr D. SPIRE

THESE DE DOCTORAT D'ETAT
PRESENTEE A L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE PARIS 6

Par

Zouaoui BOUZNAD

Chargé de cours à l' I.N.A. (Alger)

Pour obtenir le grade de Docteur es-Sciences Naturelles
Spécialité : Phytopathologie

Sujet :

CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DU GENRE *Ascochyta*
CAS PARTICULIER DE L'ETUDE BIOLOGIQUE,
ULTRASTRUCTURALE ET CYTOCHIMIQUE DES RELATIONS
HOTE-PARASITE CHEZ LE COUPLE
Pisum sativum L. / Ascochyta pisi Lib.

Soutenue le

1989 devant la Commission d'examen :

Président : Mme A. NOUGAREDE

Rapporteurs : Mr G. BOMPEIX

Mr C. ALLARD

Mme M.F. ROQUEBERT

Examineurs : Mr A. COLENO

Mr G. SALLE

Mr D. SPIRE

R E S U M E

Le travail mené sur les anthracoses a permis d'identifier les principales espèces d' *Ascochyta* inféodées aux légumineuses cultivées et spontanées en Algérie.

La caractérisation morphologique et culturale a confirmé leur hétérogénéité marquée et la confusion qui a souvent régné au sein de ce groupe de pathogènes. Par l'analyse des mécanismes ultrastructuraux de la conidiogenèse, il a été observé un mode de formation ontogénique du type phialidique, comparable à celui observé chez le genre *Phoma*.

L'aspect systématique des *Ascochyta* a été complété par une étude de la spécialisation parasitaire; en dehors de l'*Ascochyta* *pinodes* et *A. pinodella* les autres espèces ont montré une nette spécificité à l'égard de leur hôte d'origine.

Dans la partie consacrée à l'anthracose du Pois causée par *A. pisi* Lib., l'étude des exigences biologiques et du pouvoir pathogène du champignon a permis de définir les conditions de transmission de la maladie ainsi que la variabilité génétique des isolats.

Les relations hôte-parasite ont été ensuite abordées chez un phénotype sensible et un résistant. A l'aide de la M.E.B., les aspects du processus de germination des conidies et de la pénétration de l'hôte ont été précisés, en relation avec la morphologie extérieure des cultivars et la présence des cires cuticulaires. Les événements ultrastructuraux intervenus après la pénétration, jusqu'à la formation de la nécrose, ont montré des différences entre les interactions compatibles et incompatibles. La nature cytochimique de certains métabolites secrétés par la plante ou le pathogène a été discutée.

Mots clés

- Anthracoses, légumineuses,
- *Ascochyta* ssp. systématique, ontogénie,
- *P. sativum*, *A. pisi*, pouvoir pathogène, spécificité parasitaire,
- Relations hôte-parasite, interactions compatible et incompatible
- Ultrastructure, cytochimie.

A V A N T - P R O P O S

Les travaux de recherches présentés dans ce mémoire ont été pour l'essentiel réalisés à partir de 1981 dans trois principaux laboratoires: Département de Botanique (I.N.A. EL-Harrach), Station de Pathologie Végétale (Versailles) et laboratoire de Cytologie et Morphogenèse Végétales (PARIS 6). Je ne saurais oublier les résultats antérieurs obtenus au laboratoire de Pathologie Végétale (PARIS 6).

Je saisis cette occasion pour renouveler toute ma reconnaissance aux nombreuses personnalités scientifiques qui m'ont permis de soutenir ce travail en thèse.

Je voudrais tout d'abord exprimer toute ma gratitude à Madame le Professeur A. NOUGAREDE, Responsable du laboratoire de Cytologie et Morphogenèse Végétales (PARIS 6), pour l'accueil qu'elle m'a réservé au sein de son laboratoire et pour l'intérêt particulier qu'elle n'a cessé de témoigner au déroulement de ce travail. Je la remercie également pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant la présidence du jury de thèse.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur G. BOMPEIX, Responsable du laboratoire de Pathologie Végétale (PARIS 6) qui a été à l'origine de la conception du sujet traité et qui a dirigé les travaux. En fait, il s'agit de la continuité du travail de Magister qu'il a suivi auparavant en m'accueillant dans son laboratoire. Ses encouragements amicaux, son soutien moral et ses conseils ne m'ont jamais fait défaut, jusqu'à la rédaction finale du document.

Je tiens à remercier également Monsieur C. ALLARD, Directeur de recherches à la Station de Pathologie Végétale (Versailles), qui m'a accueilli avec beaucoup de bienveillance, durant les nombreux séjours de courtes et longues durées. En bénéficiant de sa longue expérience sur le sujet traité, il m'a été possible de faire progresser les travaux. Sa contribution à la reproduction du document m'a été d'une précieuse aide.

Je dois une reconnaissance toute particulière à Monsieur G. SALLÉ, Maître de Conférences au Laboratoire de Cytologie et Morphogenèse Végétales (PARIS 6), pour son aide précieuse et déterminante à la réalisation des études cytologiques et cytochimiques. Sa rigueur scientifique et son dévouement inlassable, ont permis de présenter un document, dont le mérite lui revient en partie.

Mes vifs remerciements s'adressent également à Madame M.F. ROQUEBERT, S/Directrice au Muséum d'Histoire naturelle de Paris, pour les nombreuses discussions fructueuses dont elle m'a fait bénéficiées. Elles m'ont permis une interprétation plus nuancée de certains résultats relatifs à l'ontogénie des champignons. Elle a bien voulu accepter d'être parmi les rapporteurs.

Je remercie très chaleureusement Monsieur Le Professeur A. COLENO, Professeur à l'I.N.A. de PARIS, qui malgré ses hautes occupations au Ministère de l'Agriculture, n'a émis aucune réserve pour juger ce travail.

Monsieur, D. SPIRE, Directeur de Recherches à la Station de Pathologie Végétale, pour l'intérêt qu'il porte à ce travail sur les anthracoses des Légumineuses et pour avoir bien voulu accepter de faire partie du jury.

Je tiens à exprimer ma gratitude à tous ceux qui ont apporté leur concours à la réalisation de ce travail et notamment:

- Mr COUSIN et AUDRAN de la Station d'Amélioration des Plantes de Versailles en nous fournissant le matériel végétal et la serre.
- Melle BERRIER et Mme JAUNET, de la Station de Sciences du Sol pour leur contribution à la réalisation des observations de M. E. B. (Cryoscanning).
- Mme FIALA, Responsable de la Bibliothèque de Pathologie Végétale (Versailles) qui nous a toujours assisté aux recherches bibliographiques.

Ma reconnaissance va également à toutes les personnes pour le soutien qu'ils m'ont toujours manifesté, en particulier mes collègues et amis:

- du Département de Botanique et de l'I.N.A. d'El-Harrach;
- de la Station de Pathologie Végétale de Versailles:
M. LAMARQUE, Y. MAURY, C. FERAULT, R. CHAMPION,
G. BOUDAZIN, L. BILL;
- du Laboratoire de Pathologie Végétale de PARIS 6:
P. SAINDRENAN, P. MALFATI, R. SCHAEFFER;
- aux amis intimes pour leur encouragement et soutien moral.

Je n'oublierais pas d'exprimer mes remerciements à :

- F.Z. BENHASSIR et H. TEBBAL pour leur collaboration technique à la réalisation de ce travail;
- M. MAHMOUDI pour tout le temps qu'il a consacré et le grand soin avec lequel il a assuré la dactylographie du document;
- à la famille MAMICHE Ali, pour son soutien moral et matériel.

Mes remerciements s'adressent aussi aux responsables administratifs du Ministère de l'Enseignement Supérieur (ALGERIE), de l'I.N.A. (EL HARRACH), des Relations Extérieures de l'I.N.R.A. (FRANCE) et du C.I.E.H.M. (PARIS), pour toutes les facilités qu'ils nous ont accordées à la réalisation de ces travaux.

Enfin pour terminer, j'adresse mon affectueuse reconnaissance à mon épouse SALIMA et à mes trois enfants YASMINE, NASSIM et Med NADJIB qui ont eu tant de sacrifices pour supporter mon absence physique et morale, souvent pour de longues périodes. Cette thèse leur est dédiée ainsi qu'aux parents.

S O M M A I R E

<u>AVANT PROPOS</u>	
<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	1
<u>1. HISTORIQUE</u>	2
1.1. Définition et agents responsables de l'antracnose du Pois.....	2
1.2. Distribution et extension de la maladie dans le monde.....	4
1.3. Le problème actuel des anthracnoses en Algérie.....	6
1.4. Evolution des recherches concernant le genre <i>Ascochyta</i> sur Légumineuses.....	9
1.4.1. Problèmes liés à la systématique du genre <i>Ascochyta</i>	9
1.4.2. Biologie, transmission et variabi- lité du pouvoir pathogène d' <i>Ascochyta</i> <i>pisii</i>	14
1.4.3. Aspects morphologiques et biochimiques concernant les relations hôte-parasite du couple <i>Pisum sativum/Ascochyta pisii</i> ...	18
1.5. Objet de nos recherches.....	22
<u>2. MATERIEL ET METHODE</u>	25
2.1. Plantes hôtes utilisées.....	25
2.2. Matériel fongique étudié.....	27
2.3. Etude des caractères morphologiques des <i>Ascochyta</i> spp.	31

2.4.	Etude des caractères ontogéniques.....	32
2.5.	Etude in vitro de quelques caractères biologiques des <i>Ascochyta</i> spp.....	35
2.6.	Etude de la variabilité du pouvoir pathogène des <i>Ascochyta</i> spp.....	43
2.7.	Techniques d'inoculation artificielle.....	47
2.8.	Etude des relations hôte-parasite en microscopie électronique à balayage (M. E. B.).....	53
2.9.	Etude des relations hôte-parasite en microscopie électronique à transmis- sion (M. E. T.).....	55
3.	<u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	67
3.1.	Principales espèces d' <i>Ascochyta</i> spp. identi- fiées sur Légumineuses en Algérie.....	67
3.1.1.	Recensement des espèces fongiques isolées.....	67
3.1.2.	Discussion.....	75
3.2.	Caractérisation morphologique et ontogéni- que des <i>Ascochyta</i> spp. isolées à partir des Légumineuses.....	77
3.2.1.	Variations morphologiques et culturales.....	77
3.2.2.	Etude de l'ontogénie des espèces.....	86
3.2.3.	Discussion.....	92
3.3.	Effets des facteurs biotiques et abiotiques sur le comportement in vitro de l' <i>Ascochyta</i> <i>pisii</i>	97
3.3.1.	Influence du milieu de culture sur la croissance et sur la sporulation.....	97
3.3.2.	Influence de la température sur la croissance et sur la sporulation.....	99

3.3.3.	Action de la lumière et de l'obs- curité sur la croissance mycélienne et sur la sporulation.....	102
3.3.4.	Influence de quelques facteurs sur la germination des spores de l' <i>Ascochyta pisi</i>	102
3.3.5.	Description du processus germinatif.....	107
3.3.6.	Discussion.....	110
3.4.	Pouvoir pathogène d' <i>Ascochyta pisi</i> sur les légumineuses et facteurs de transmission par la graine.....	114
3.4.1.	Pathogénicité de l' <i>Ascochyta pisi</i> à l'égard des Légumineuses.....	114
3.4.2.	Sensibilité du Pois aux autres espèces d' <i>Ascochyta spp.</i>	115
3.4.3.	Compatibilité et incompatibilité du Pois (<i>Pisum sativum</i>) à l'égard des isolats d' <i>Ascochyta pisi</i>	117
3.4.4.	Facteurs influençant la transmission de l' <i>Ascochyta pisi</i> par la graine.....	124
3.4.5.	Discussion.....	131
3.5.	Etude en M.E.B. des relations hôte - parasite : germination et pénétration de l' <i>Ascochyta pisi</i> . Comparaison d'un hôte sensible et d'un hôte résistant.....	138
3.5.1.	Présentation de l'hôte sain: Aspect de la surface cuticulaire du Pois (<i>Pisum sativum</i>).....	138
3.5.2.	Modalités de germination d' <i>Ascochyta pisi</i> sur hôtes sensible et résistant.....	140
3.5.3.	Modalités de pénétration d' <i>Ascochyta</i> <i>psii</i> chez des couples compatibles (sensible) et incompatible (résistant)...	142
3.5.4.	Rôle de la cuticule et des cires cuticulaires comme barrière physique à la pénétration.....	146
3.5.5.	Discussion.....	146

3.6. Etude ultrastructurale des relations hôte-parasite: comparaison de l'hôte résistant et de l'hôte sensible.....	152
3.6.1. Structure des tissus de l'hôte sain et du champignon.....	152
3.6.2. Pénétration et comportement de l' <i>Ascochyta pisi</i> durant la phase de colonisation de l'hôte.....	155
3.6.3. Modifications ultrastructurales de l'hôte.....	156
3.6.4. Modifications ultrastructurales subies par le champignon.....	159
3.6.5. Discussion	160
3.7. Identification histochimique et cytochimiques de quelques composés accumulés lors de l'interaction entre <i>Pisum sativum</i> et <i>Ascochyta pisi</i>	167
3.7.1. Détection des composés de nature callosique.....	167
3.7.2. Détection des composés de nature polysaccharidique.....	168
3.7.3. Mise en évidence de quelques activités enzymatiques.....	169
. Détection de la phosphatase acide.....	169
. Détection de la polyphénoloxydase.....	170
. Détection de l'activité peroxydasique...	171
3.7.4. Discussion.....	171
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	177
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	186

PRINCIPALES TECHNIQUES D'OBSERVATIONS UTILISEES

Fig. 34 à 42	Microscopie en contraste de phase interférentiel
Fig. 44 à 51	Microscopie photonique avec coloration au bleu de toluidine
Fig. 57 à 66 71 et 72 74 et 75 78 à 81	M.E.T., contraste citrate de plomb-acétate d'uranyle
Fig. 67 à 70	Test PATAg (cf. techniques)
Fig. 76 et 77 85 à 87	Microscopie photonique, coloration nucléaire au GIEMSA
Fig. 88	Microscopie photonique sans coloration
Fig. 92 à 97 102 à 105 107 à 126	M.E.B. en cryoscanning
Fig. 98 à 101 106	M.E.B. par le point critique
Fig. 127 à 130	Microscopie photonique, coloration au paragon
Fig. 131 à 140	M.E.T., contraste au citrate de plomb-acétate d'uranyle
Fig. 141 à 147 148 à 151	Microscopie photonique, coloration au paragon
Fig. 152 à 180	M.E.T., Contraste citrate de plomb - acétate d'uranyle
Fig. 181 et 182	Microscopie photonique au bleu d'aniline, observation en U.V. (518 nm)
Fig. 183	Microscopie photonique en lumière visible
Fig. 184 - 188	Test PATAg, (cf. techniques)
Fig. 189 à 193	Test cytochimique de remise en évidence de la phosphatase acide (cf. techniques)
Fig. 194 à 198	Test cytochimique de remise en évidence de la polyphénoloxydase (DOPA) (cf. techniques)

ABREVIATIONS UTILISEES

App:	Appressorium	Mp :	Membrane plasmique
ap :	apositions pariétales	mp :	membrane plastidiale
CH :	Chloroplaste	M. :	Mitochondrie
Ci :	Cires cuticulaires	Myc:	Mycélium
Cl :	Cloison	N. :	Noyau
Cc :	Cellule conidiogène	Nec:	Necrose
Cep:	Cellule épidermique	Mu :	Mucilage
Co :	Conidie	Ost.:	Ostiole
Cpa:	Cellule du parenchyme	Pc :	Paroi cellulaire
Wo :	Corps de WORNIN	P.pyc:	Paroi pseudoparenchymateuse de la pycnide
Cph:	Col phialide	P.hy:	Paroi de l'hyphe
Cx :	Corps X	P.h:	Paroi de l'hôte
Cp :	Couche pariétale	P.Co:	Paroi de la conidie
Cu :	cuticule	Pa :	Papille
Cy.h:	cytoplasme hôte	Ph.:	Phialide
Cy.hy:	Cytoplasme hyphe	Pg :	Plastoglobules
Do :	Dépôts osmiophiles	P :	Pore
Di :	Dictyosome	Po :	Précipités osmiophiles
gl :	globules lipidiques	Pyc:	Pycnide
GL.:	Glycogène	Pl.:	Plasmalemme
Gd :	Globules denses aux électrons	Pep:	Paroi épidermique
Gr :	Granum	RE :	Réticulum Endoplasmique
Ga :	Grains d'amidons	Ri :	Ribosomes
Hy :	Hyphe	sep:	septum
Hy.c:	Hyphe cuticulaire	Smy:	Stroma mycelien
hy.i:	hyphe intracellulaire	Spyc:	Stroma pycnidien
hy.e:	hyphe intercellulaire	Sv :	Structure vésiculaire
Lo :	Lomasome	G :	Tube germinatif
mi :	matériel intercellulaire	Thy:	Thyllokoïdes
me :	méat	Va :	Vacuoles

INTRODUCTION GENERALE

La production des grandes cultures en Algérie est confrontée à de nombreux problèmes, qui constituent un obstacle à son développement. Les aspects phytotechniques (fertilisation, date de semis, profondeur et densité de semis, désherbage, choix variétal etc...), en sont parfois la cause, cependant les problèmes phytosanitaires souvent ignorés entraînent de lourdes pertes. Bien qu'il n'existe pas de données exactes à ce sujet de nombreux rapports attribuent la stagnation ou la baisse des rendements à des maladies. La modernisation de l'agriculture a fait appel à des moyens de production performants (utilisation de variétés à haut rendement, fertilisation, irrigation, importation de semences etc...), et a été marquée souvent par une rupture de l'équilibre des agro-écosystèmes.

Il en est résulté en particulier dans notre pays, soit une introduction de nouveaux pathogènes, soit une multiplication d'espèces qui étaient jusqu'à lors à l'état endémique. Par exemple, les légumes secs, principales cultures vivrières après les céréales, n'ont pas échappé à la menace des anthracoses causées par des *Ascochyta* spp.

Face à cette situation, nous avons profité de la structuration de la recherche agronomique à l'I.N.A. (El-Harrach) en 1977, pour nous préoccuper de l'anthracose du Pois causée surtout par *A. pisii*.

Dès lors, et sans ignorer l'apport des autres moyens de lutte (amélioration des techniques culturales, lutte chimique, emploi de semences saines etc...), l'utilisation éventuelle de la résistance variétale a été notre objectif à long terme, d'où l'intérêt des études entreprises en vue d'approfondir d'abord nos connaissances sur le parasite et de mieux définir ensuite les facteurs de résistance chez le couple *Ascochyta pisii* / *Pisum sativum*.

1. HISTORIQUE

1.1. DEFINITION ET AGENTS RESPONSABLES DE L'ANTHRACNOSE DU POIS

Le terme anthracnose a un sens imprécis en pathologie végétale. ROGER (1958), puis MESSIAEN et LAFON (1963) désignent par "anthracnose" des altérations nécrotiques brunes ou noires, de forme quelconque mais d'étendue limitée, pouvant affecter les feuilles, les tiges, les fruits, les rameaux ou les écorces pour les végétaux ligneux.

Initialement, cette dénomination a été surtout réservée aux lésions provoquées par les champignons de l'ordre des Mélanconiales et plus particulièrement à celles causées par les espèces du genre *Collectotrichum*.

En étudiant l'anthracnose du melon provoquée par *Collectotrichum lagenarium* (Pass.) Ell. et HALST., TOUZE (1964) a précisé l'origine du terme qui vient de grec "anthrax" = ulcère et de "nose" = maladie. Le processus physiologique qui aboutit à la formation des ulcérations nécrotiques, caractéristiques de cette affection, est maintenant précisé (TOUZE, 1964; HEATH et WOOD, 1969).

Pour la majorité des Légumineuses, les anthracnoses constituent un groupe très important de maladies affectant les différents stades de développement de ces cultures. L'agent causal est, dans la plupart des cas, un champignon à pycnides du genre *Ascochyta*.

AGENTS RESPONSABLES DE L'ANTHRACNOSE DU POIS

Depuis les travaux de JONES (1927), SATAR (1933) HARE et WALKER (1944), il a été définitivement reconnu, que l'anthracnose du Pois était causée en réalité par trois espèces

bien distinctes appartenant au genre *Ascochyta*: *A. pisi*, *A. pinodes* (*Mycosphaerella pinodes*) et *A. pinodella*. La littérature relative à cette maladie, citée par ces auteurs, faisait état d'une confusion qui a longtemps régné entre les différentes espèces. Ainsi, STONE (1912) considérait que *A. pisi* décrite pour la première fois par LIBERT (1830) était la forme parfaite de *Mycosphaerella*, cette dernière ayant été précisée par JONES (1927). De même la classification des genres et des espèces responsables des anthracoses sur Légumineuses (LINDFORD et SPRAGUE, 1927; SPRAGUE, 1929) maintenait encore quelques imprécisions, où *A. pinodella* était considérée comme une microforme de l'espèce *A. pinodes*.

Par la suite, les descriptions reprises par SKOLKO et al., (1954) et par WALKER (1969) établissent que les trois espèces se différencient les unes des autres par les symptômes qu'elles provoquent au niveau de la plante, la localisation des lésions et les caractères morphologiques des pycnidiospores:

Ascochyta pisi Lib.: cette espèce provoque des nécroses déprimées circulaires au niveau des différents organes (feuilles, tiges, gousses), ayant une coloration marron clair et un contour toujours bien délimité par une marge plus foncée. Les lésions provoquées sur les tiges sont plus allongées que celles existant au niveau des autres organes. Au centre des taches, la présence de petits points noirs est souvent observée. Ce sont des pycnides disposées généralement en cercles concentriques; la forme sexuée n'est pas actuellement connue.

Mycosphaerella pinodes (BERK. et BLOX.) VESTERG avec la forme parfaite: *Ascochyta pinodes* L.K. JONES, provoque des taches brunes irrégulières susceptibles d'affecter l'ensemble de la plante. Les lésions les plus remarquables se localisent le plus souvent au niveau des noeuds ainsi que sur les parties basses de la plante. La coloration des taches

est plus sombre que dans le cas précédent; les pycnides sont beaucoup moins saillantes.

Ascochyta pinodella L.K. JONES dénommée aussi *Phoma medicaginis* MALBR. et ROUM. var. *pinodella* JONES, cette dernière espèce de moindre importance provoque des symptômes qui sont proches de ceux causés par *A. pinodes*. *A. pinodella* est habituellement responsable d'une pourriture des racines et les taches nécrotiques sont rares sur feuilles et sur gousses. La forme sexuée n'est pas non plus connue pour cette espèce.

Morphologiquement, les trois *Ascochyta* peuvent se distinguer par les dimensions de leurs conidies; cependant, le tableau 1 montre la variabilité des mensurations des différentes souches examinées par divers auteurs.

1.2. DISTRIBUTION ET EXTENSION DE LA MALADIE DANS LE MONDE

Les premières descriptions de cette maladie ont été faites aux Etats Unis dès le début du siècle. En effet JONES (1927) et SPRAGUE (1929) signalaient déjà l'importance des dégâts sur les cultures de Pois. Par la suite et sur le même continent, la maladie a été signalée plus au Nord, au Canada où pendant de nombreuses années, elle a entraîné de sérieux dommages (LYALL et WALLEN, 1958).

Dans une étude sur la désinfection interne des semences de Pois infectées par *Ascochyta pisi*, DEKKER (1957), rapporte l'extension alarmante de cette maladie à travers plusieurs régions de Hollande.

Dans les pays de l'Est, cette maladie s'est manifestée avec la même intensité, notamment en URSS dont les dégâts ont été rapportés par BONDARTZEVA et al., (1937) KSENDZOVA(1976) puis DOROZHKIN et KREMNEVA(1976).

Tableau 1 : DIMENSIONS DES SPORES DES ESPECES D'Ascochyta RESPONSABLES DE L'ANTHRACNOSE DU POIS OBTENUES PAR PLUSIEURS AUTEURS

AUTEURS	ESPECES	A. pusi	A. pinodes	A. pinodella
SACCHARDO (1896)		14-25 X 4-4,5*		
SPRAGUE (1927)		6-19 X 2,5-6		
VIENNOT-BOURGAIN (1949)		13-16 X 3-5		
ANSELME et CHAMPION (1962)		10-16 X 3,5-6	10-16 X 4-7	6-10 X 3
LEACH (1962)		17,9 X 4,9		
BAJAN (1968)		11-14,3 X 4,5-5	10,8-12,6X5,8-6,2	5-7,8X4,6-6
MADHOSINGH WALLEN (1968)			9,3-11,5X4,2-5,1	
CHAMPION (1969)		13,9 X 4,2	12,3 X 4,5	7,8 X 3,7
WALKER (1969)		"	"	"
MESSIAEN-LAFFON (1969)		"	"	"
PUNTHALLINGAM et HOLLIDAY (1972)		10-16 X 4,5	8-16 X 3-4,5	5-8 X 2,5-4
BOEREMA et VERHOENVEN (1979)		11-16 X 3-4		
BOUZNAD (1978)		14-14,5 X 4-4,5		
SUTTON (1980)		11,5-14,5X3,5-4,5		
MOHAMMEDI (1984)		7,5-20 X 2,5-6	6,25-16,25X2,5-5	3,75-10X2-5
WEGRZYCKA (1984)		12,3-15,7X3,2-4,8	9,1-12,7X4,5-6,5	8,7-14,6X3,9-6,3
ALLARD (Comm. pers.)		11,2-14,4	12,0-17,2	

* Longueur X Diamètre exprimés en µm.

En Pologne, BAJAN (1978) et WEGRZYCKA (1984), considèrent que la culture du Pois reste fortement limitée par la présence des *Ascochyta* spp. De même SUSURI (1976) signale l'importance de ces espèces en Yougoslavie.

En France, dans la plupart des lots de semences récoltées et dans les cultures de plein champ, la présence de l'antracnose et notamment celle due à *A. pisi*, a été longtemps la plus fréquente (ALLARD, 1965; CHAMPION, 1969, 1981; ANSELME et CHAMPION, 1967; ANSELME et al., 1970). Ceci a justifié depuis plus de deux décennies maintenant la priorité donnée aux programmes de recherche pour l'amélioration du Pois contre l'antracnose.

Les pays du Maghreb n'ont pas échappé à ce véritable fléau. En Algérie, les premiers échantillons de Pois montrant des attaques d'antracnose, ont été récoltés et conservés dans l'herbier phytopathologique de l'I.N.A. (El-Harrach), depuis 1925. Nous avons d'ailleurs noté pour ces échantillons une confusion entre les symptômes observés sur gousses et sur feuilles et l'identification de l'espèce mentionnée. Nous avons estimé que les deux espèces *A. pisi* et *A. pinodes* étaient mélangées sous l'appellation *A. pisi*.

A part ces échantillons très anciens, aucune étude antérieure n'a été signalée en Algérie, et ce jusqu'en 1975, époque où nous sommes intéressés aux problèmes phytosanitaires des semences de Pois produites dans le pays.

1.3. LE PROBLEME ACTUEL DES ANTHRACNOSES EN ALGERIE

La production des cultures légumières en Algérie n'a connu un début de développement qu'à partir des années 1970, avec notamment la mise en place par le M.A.R.A.

(Ministère de l'Agriculture et de la Réforme Agraire) de l'époque, d'un projet F.A.O. dit "Algérie 29". A partir de 1974, cette structure a été remplacée à l'échelle nationale, par une autre structure: l'I.D.C.M. (Institut de Développement des Cultures Maraîchères). Cet Institut avait pour mission de répondre aux exigences, en matière de cultures légumières, d'une agriculture qui devait passer d'un type traditionnel, à une agriculture moderne.

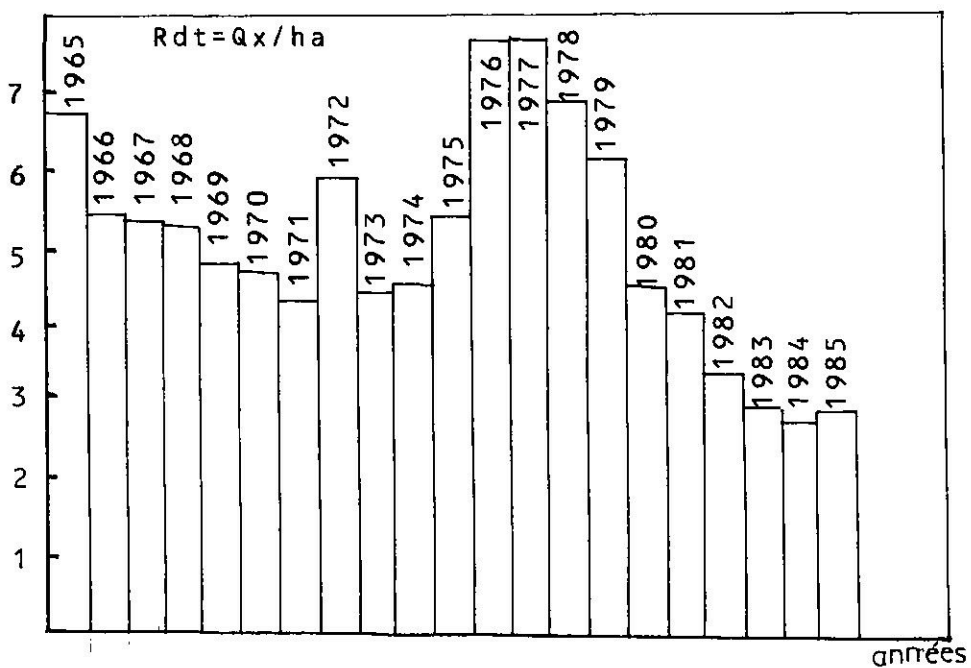
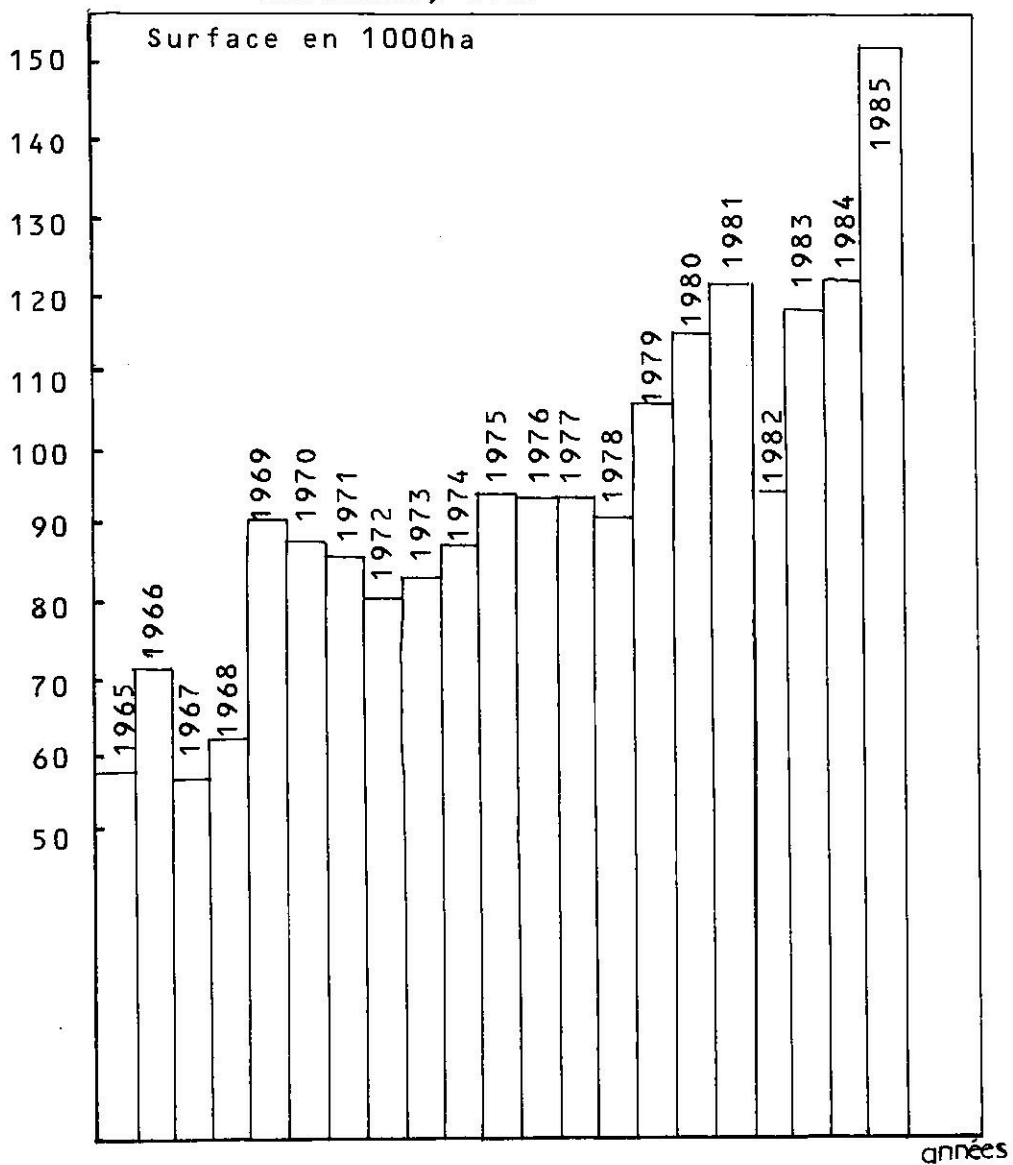
L'un des objectifs assignés à cette nouvelle structure était de combler un déficit de plus en plus important en semences. Dans un premier temps, l'I.D.C.M. a procédé à une importation massive de semences destinées à être multipliées. Durant cette période, on ne se préoccupait que des semences pour la production de Pois et de Haricots verts; Les autres semences de légumes secs (Pois chiches, Pois secs, Fèves, Lentilles, Vesces etc...) dépendaient d'un autre organisme: l'I.D.G.C. (Institut de Développement des Grandes Cultures).

Depuis, les bilans de chaque campagne agricole montrent que la superficie de l'ensemble des Légumineuses connaît une augmentation rapide, elle est passée de 82 000 ha en 1971 à plus de 150 000 ha en 1985 (Fig. 1).

Malheureusement, l'extension de ces cultures s'est traduite chaque année par un emploi de plus en plus fréquent de lots de semences contaminées. Nous ne citerons que les cas de la production de semences de Pois, cultivar "Douce de Provence", largement multipliées à l'Ouest du pays. Leur taux d'infection par *Ascochyta blight*, déjà important en 1973 - 74 (15%), est passé, dans la même zone de multiplication, à 51% (BOUZNAD, 1976).

L'importance de cette maladie révélée par les travaux d'analyses des semences (BOUZNAD, 1976 et 1982 ;

Fig. 1: Evolution des superficies et des rendements pour les principales cultures de légumes secs (1965 - 1985). (M.A.R.A., 1985)



SAHNOUN, 1977) et l'extension constatée par la suite de l'ensemble des maladies à anthracnose sur la plupart des Légumineuses cultivées, nous a incité à prendre en charge ce thème de recherche.

De plus, il apparaît que *A. pinodes* et *A. pinodella* qui étaient insignifiantes il ya quelques années sont de plus en plus détectées dans les analyses de semences et en cultures. Les résultats que nous présenterons pour *A. pisi* pourront être nous l'espérons extrapolés, dans certaines limites, à ces deux dernières espèces.

1.4. EVOLUTION DES RECHERCHES CONCERNANT LE GENRE *Ascochyta* SUR LEGUMINEUSES

Dans les paragraphes précédents, nous avons essayé de situer et de définir l'importance du groupe des anthracoses chez les Légumineuses, avec une attention plus particulière pour l'espèce *A. pisi*.

Nous avons jugé ensuite nécessaire de rappeler l'état de nos connaissances dans les principaux domaines qui nous préoccupent:

- la systématique du genre *Ascochyta*;
- la biologie avec la variabilité du pouvoir pathogène et les aspects de la lutte liés à la transmission par les semences;
- les aspects morphologiques et biochimiques se rapportant aux relations hôte-parasite dans le cas du couple *Pisum sativum*/ *Ascochyta pisi*.

1.4.1. PROBLEMES LIES A LA SYSTEMATIQUE DU GENRE *Ascochyta*

Les premiers travaux de recherche effectués sur les anthracoses des Légumineuses causées par le genre

Ascochyta ont été orientés au début vers les problèmes d'identification. LINDFORD et SPRAGUE (1927), puis SPRAGUE (1929) ont tenté d'établir une classification en comparant les caractères morphologiques des espèces fongiques isolées du Pois (*A. pisi*, *A. pinodes* et *A. pinodella*) avec ceux d'autres espèces (*A. viciae*, *A. lathyri* et *A. fabae*) isolées à partir des Légumineuses comme la Vesce, la Gesse et la Fève.

Par des inoculations expérimentales, ces auteurs ont montré la large gamme d'hôtes d'*A. pisi* et d'*A. pinodes* sur certaines Légumineuses et ont insisté sur la similitude existant entre *A. pisi*, *A. viciae* et *A. fabae*.

Une comparaison entre *A. pinodella* et certaines espèces du genre *Phoma* a permis à DENIS (1935) et à BOEREMA et al., (1965) de reconsidérer la position taxonomique d'*A. pinodella*.

ROGER (1958) a noté pour sa part la variabilité des caractères morphologiques du genre *Ascochyta* montrant ainsi la difficulté de la distinction entre les différentes espèces.

Cette situation est une des raisons pour laquelle, pendant longtemps, l'hôte a constitué un des éléments essentiel dans la détermination des espèces. Bien évidemment, les conclusions sont erronées lorsqu'il s'agit d'espèces polyphages.

Cette difficulté taxonomique s'explique par l'absence d'une partie du cycle de reproduction: la phase sexuée. De plus, les caractères morphologiques retenus habituellement dans les différentes clés de détermination et de classification des champignons imparfaits (VUILLEMIN, 1911; HUGHES, 1953; BARNETT, 1962; BARON et TUBAKI, 1967),

ne permettent pas une distinction toujours rigoureuse. Surtout lorsqu'il s'agit de distinguer certaines espèces des genres *Ascochyta* et *Phoma*.

S'il n'y a pas de problème majeur pour définir l'appareil sporifère et le type de spores pour un champignon donné, en revanche la genèse et le mode de libération des spores (caractères fondamentaux de différenciation), n'ont pas été clairement établis. Ce n'est que depuis les deux dernières décennies, avec le développement de la microscopie électronique à balayage (M.E.B.) et à transmission (M.E.T.), qu'il a été possible de préciser les détails de la sporogenèse. Tous ces aspects ontogéniques caractérisant les champignons imparfaits ont été largement discutés lors du Congrès International tenu au Canada (KANASANSKI 1969), dont l'essentiel des travaux a été publié par KENDRICK (1971).

Antérieurement, BREWER et BOEREMA (1965) avaient relevé des différences entre quelques espèces des genres *Ascochyta* sp. et *Phoma* sp.; notamment dans le mode de détachement de leurs conidies.

Cette étude de la conidiogenèse a été reprise par BOEREMA et BOLLLEN (1975). Ces auteurs ont proposé deux processus ontogéniques différents: l'un annellidique pour le genre *Ascochyta* et l'autre phialidique pour le genre *Phoma*. Cependant pour PUNITHALINGAM (1979) et SUTTON (1980), les anneaux des *Ascochyta* observés en microscopie photonique ressemblent aux phialides des *Phoma*.

Le terme de phialide, employé pour la première fois par VUILLEMIN (1910), est relatif aux cellules conidiogènes en forme de bouteille qui produisent les conidies des champignons. Par la suite, HUGHES (1953) a distingué un autre mode de formation ontogénique des conidies dans sa nouvelle clé de détermination des Hyphomycètes.

Très proche du type phialidique, ce deuxième type de conidiophore se distingue du premier par la présence de cicatrices successives laissées à la place de chaque conidie détachée. Ce dernier auteur a donc proposé le terme annellophore pour les espèces dont le conidiophore est soumis à une élongation après la formation de chaque nouvelle conidie. Il en résulte une annellation dont le nombre d'anneaux correspond au nombre de conidies formées. Ces annellations sont plus ou moins visibles en fonction des variations de croissance des conidiophores après la libération de chaque conidie. D'ailleurs, toutes les confusions qui existent entre les types phialidique et annellidique résultent de cette croissance qui n'est pas toujours facile à observer.

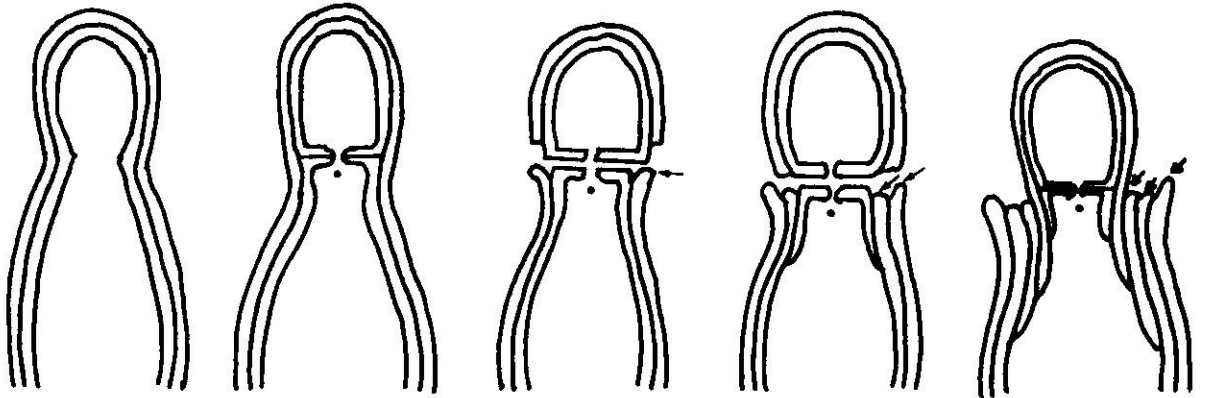
Ultérieurement, et après les orientations données par le colloque de KANASANSKI tenu en 1969 (KENDRICK, 1971), des études approfondies réalisées sur l'ultrastructure des processus ontogéniques d'un grand nombre d'espèces, ont permis d'établir les caractères de base qui différencient chaque type ontogénique.

D'après les travaux récents de COLE et SAMSON (1979) et ceux de MINTER et al, (1982, 1983), les spores des champignons imparfaits sont caractérisées par deux principaux modes de formation ontogéniques: le mode blastique et le mode thallique.

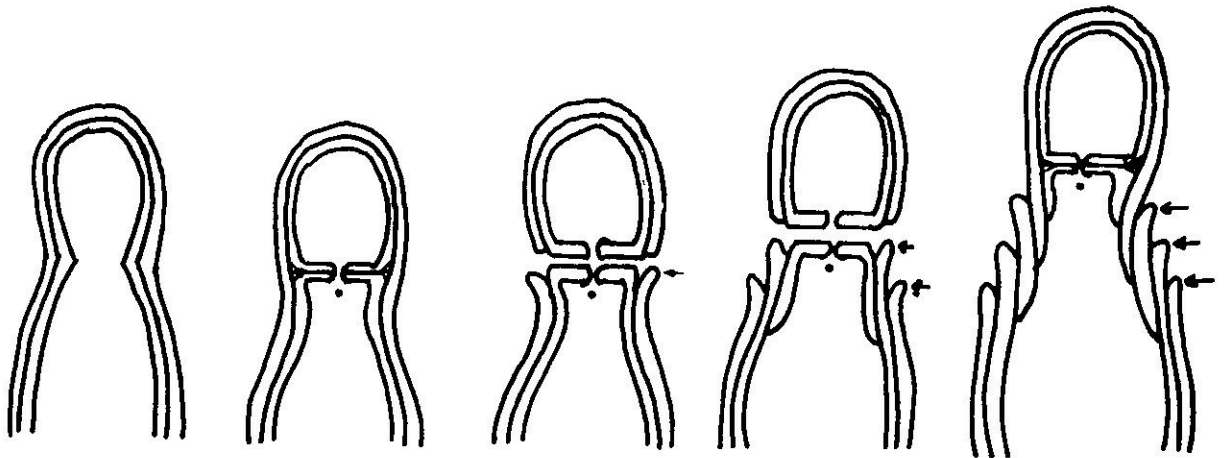
Dans le cas du mode blastique qui nous intéresse plus particulièrement, il a été montré qu'au niveau du type phialidique (Fig.2), la paroi de la conidie est formée sans la participation directe de la paroi interne du conidiophore: le processus est dit entéroblastique.

En revanche chez le type annellidique (Fig.2), la conidiogenèse apparaît holoblastique, c'est à dire que les parois de la cellule conidiogène^{ne} sont pas impliquées dans la formation de la future conidie.

Fig. 2: Schéma comparatif entre le mode de formation ontogénique des spores du type phialidique et celui du type annellidique. (d'après MINTER et al, 1982)



- Cas du mode phialidique chez *Trichoderma saturnisporum*



- Cas du mode annellidique chez *Scopulariopsis brevicaulis*

Le deuxième caractère fondamental qui permet de différencier les deux modes de formation des conidies, est la croissance ou non du conidiophore. Dans le type annellidique, la plupart des auteurs notent après chaque formation d'une nouvelle conidie une certaine élongation du conidiophore. Ce conidiophore subit une croissance, dite indéfinie, dont l'importance peut être variable d'une espèce à l'autre.

Dans le type phialidique, il n'y a pas d'élongation du conidiophore au point de formation des conidies. Il en résulte par contre un élargissement du col du conidiophore (ici phialide).

L'importance de cette largeur, liée au nombre de conidies formées, est matérialisée par un ensemble lamellaire très caractéristique d'une phialide (ROQUEBERT; 1977; ROQUEBERT et FAYERT, 1982); dans ce cas le conidiophore est dit à croissance définie.

Compte tenu de ces données, notre travail est destiné à apporter des précisions sur le mode de conidiogenèse des *Ascochyta* et, par là-même, à les caractériser.

1.4.2. BIOLOGIE, TRANSMISSION ET VARIABILITE DU POUVOIR PATHOGENE D'A. pisi

Bien que l'importance des dégâts provoqués par ce pathogène et les causes de cette maladie aient été établies depuis le début du siècle, il a fallu attendre les années cinquante pour voir apparaître les premiers travaux sur les conditions de développement *in vitro* du champignon (BREWER et MACNEIL, 1953). Depuis, plusieurs aspects relatifs aux exigences nutritionnelles du champignon (source de carbone et d'azote) ont été abordés, définissant ainsi les formes assimilables en certains éléments nutritifs nécessaires à la croissance et à la sporulation (BREWER, 1960; BAJAN, 1968).

L'effet de la lumière a surtout été étudié par LEACH (1962), ainsi que BLACKEMAN et DICKINSON (1967). Les auteurs ont montré que le comportement du champignon peut être influencé par la qualité de la lumière; certains isolats d'*A. pisi* avaient une sporulation nettement favorisée par une exposition sous des longueurs d'ondes comprises entre 230 et 290 nm.

Parmi les autres facteurs abiotiques, SUSURI (1976) s'est intéressé, entre autre, à l'action de la température. Il a déterminé les conditions optimales de croissance et de sporulation d'*A. pisi* situées à 20°C.

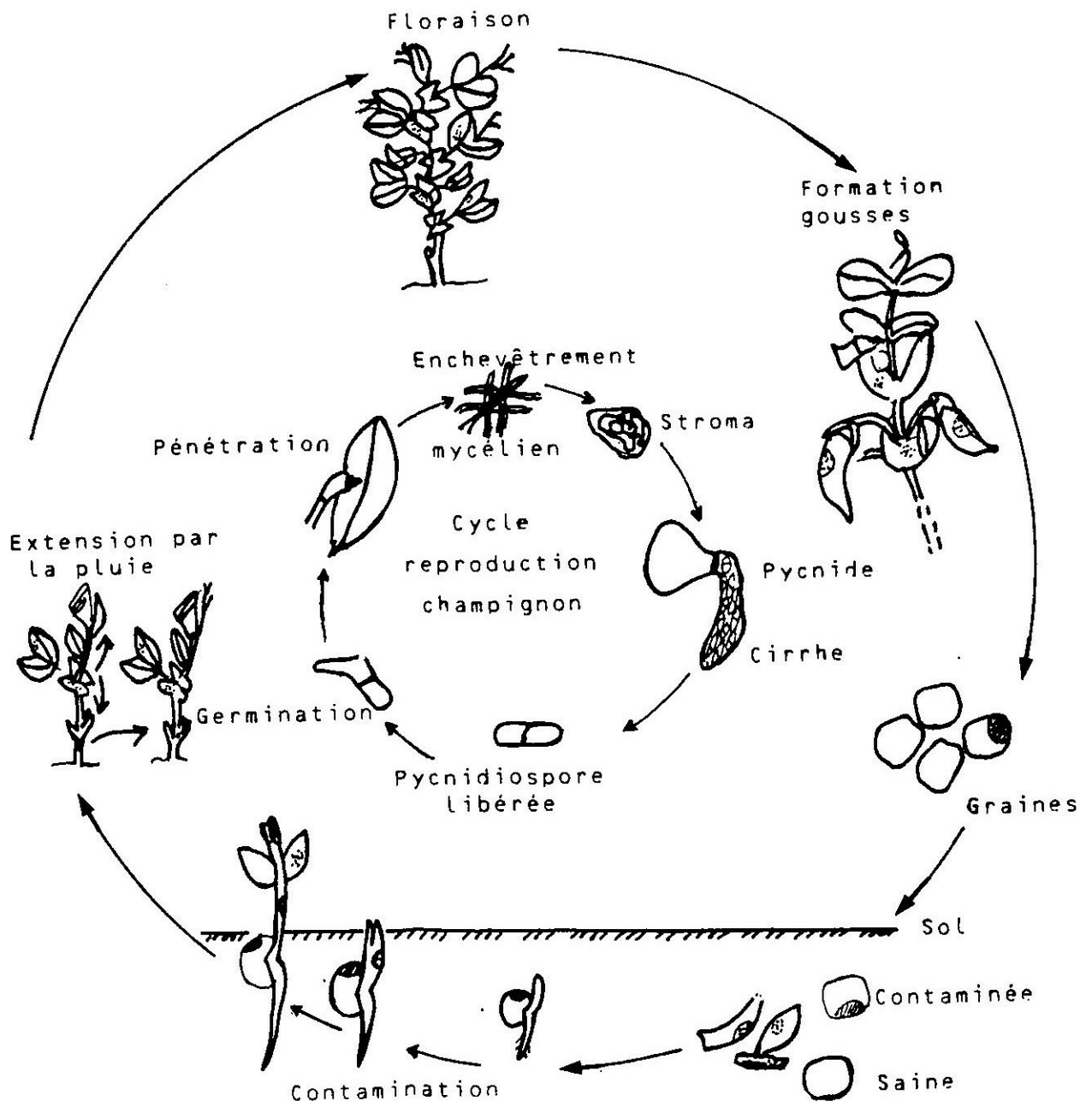
Pour notre part, la nécessité de mieux connaître le matériel biologique dont nous disposions, nous a conduit à préciser l'action de tous ces facteurs sur la reproduction du champignon (BOUZNAD, 1978). Quelques uns des résultats essentiels seront repris dans le présent travail.

Peu d'études ont été consacrées aux conditions naturelles de la reproduction du pathogène, en tant que facteur épidémiologique. Seules quelques données fragmentaires signalent le rôle des débris de plantes infectées comme moyen de conservation de l'inoculum dans le sol pour les contaminations primaires (WALLEN, 1955; WALLEN et JEUN, 1968; WALKER, 1969; SHERIDAN, 1981).

En revanche il a été établi que la contamination intra-embryonnaire des graines (DEKKER, 1957), constitue la voie la plus efficace de transmission et de dissémination d'*A. pisi*. L'infection primaire des plantules commence dans ce cas par les feuilles cotylédonnaires puis elle s'étend progressivement aux parties supérieures de la plantule (NEERGARD, 1977). A partir de ces foyers primaires, tous les auteurs (NEERGARD, 1977; WALKER, 1969; ANSELME, 1967) considèrent que la propagation de la maladie est favorisée par l'humidité. Les gouttelettes de pluie arrivant au contact des organes végétaux provoquent des éclaboussures qui assurent la dispersion des conidies. Schématiquement, nous nous sommes inspiré des travaux réalisés par ALLARD et al. (communication personnelle) sur *A. pinodes*, pour reproduire le cycle biologique de l'*A. pisi* (Fig. 3). Ce schéma résume les différentes étapes

de la contamination et de la reproduction du champignon, telles qu'elles se déroulent dans la nature. On constate que les semences contaminées et les débris de cultures sont les sources principales des infections primaires.

Fig. 3: Cycle biologique de l' *Ascochyta pisi* Lib.



En Algérie, les zones semi-arides à pluviosité réduite ne sont pas épargnées. Dans ces conditions, l'inoculum primaire, apporté par la graine, progresse de proche en proche avec les rosées matinales (BOUZNAD, 1976).

La localisation d'*A. pisii* au niveau des tissus internes des graines a constitué pendant longtemps la préoccupation majeure pour de nombreux chercheurs (DEKKER, 1957; BAJAN, 1968; CHAMPION, 1969 et 1983; ANSELME et al., 1970; BOUZNAD, 1976; SUSURI, 1976; RUOKOLA, 1979). Des techniques appropriées ont été mises en oeuvre pour la détection et l'identification des agents responsables de l'antracnose du Pois dans l'analyse sanitaire des semences.

De même, l'importance des dégâts causés lors de la levée des plantules et l'extension de la maladie à partir des foyers primaires, ont conduit d'autres auteurs à étudier l'efficacité des traitements chimiques pour la désinfection des semences (MAUDE, 1965; MAUDE et KYLL, 1970; SAHNOUN, 1977; CHAMPION et al., 1984).

La lutte chimique a permis de limiter les dégâts causés par la maladie, mais la recherche de variétés résistantes a constitué aussi un autre moyen complémentaire, ce qui nécessite aussi une étude de la variabilité du pouvoir pathogène d'*A. pisii*. Cette approche constitue un préalable à tout programme d'amélioration génétique.

A cet effet les premières études effectuées par WALLEEN (1957), ont permis de reconnaître l'existence de quatre races distinctes d'*A. pisii* au Canada. Des travaux plus récents (HUBBELING, 1972, 1984; COUSIN, 1972, 1984) ont permis de caractériser une autre race, différente de celles déjà décrites au Canada. Ce qui porte aujourd'hui à cinq le nombre total de races ou pathotypes connus dans le monde.

1.4.3. DONNEES BIOCHIMIQUES ET MORPHOLOGIQUES
CONCERNANT LES RELATIONS HOTE-PARASITE
DU COUPLE *Pisum sativum*/*Ascochyta pisi*

Les premières études ayant porté sur la physiopathologie de cette maladie ont été menées par HEATH et WOOD (1971). Ces auteurs ont montré l'existence et le rôle des enzymes pectinolytiques et hemicellulotiques dans la dégradation des cellules de l'hôte; ils ont également établi les modalités de formation de la nécrose et constaté une accumulation de composés phénoliques.

Des précisions complémentaires ont été apportées par nos précédents travaux sur la variation qualitative et quantitative d'un plus grand nombre d'enzymes impliquées éventuellement dans la pathogénèse (BOUZNAD, 1978). C'est ainsi que nous avons mis en évidence *in vitro* et *in vivo* une autre gamme d'activités enzymatiques jamais signalées auparavant pour le couple *Pisum sativum*: *A. pisi*.

Nous remarquons que ces recherches préliminaires en utilisant la technique "Api-zym", nous avait permis de détecter entre autres: la phosphatase acide, la phosphatase alcaline, des lipases et des estérases. Leur concentration augmentait très significativement avec le pouvoir pathogène des isolats et le temps d'incubation. Certaines de ces enzymes ont été confirmées plus récemment par HOFFMAN et TURNER, 1982. Toutes les activités enzymatiques détectées *in vivo* et *in vitro* par *A. pisi* sont résumées dans le tableau 1~~4~~5.

Par ailleurs des phytoalexines sont accumulées dans les cellules de l'hôte après attaque du Pois (CRUICKSHANK et PERRIN, 1965; HEATH et WOOD, 1971). Il s'agit principalement de la pisatine. Ces derniers auteurs ont montré l'existence d'une corrélation générale entre la résistance des cultivars testés et la production de pisatine dosée après infection.

Tabl. 1 bis Principales activités enzymatiques secrétées
in vivo et in vitro par *Ascochyta pisi* Lib.

Auteurs	HEATH et WOOD (1971)		KSENDZOVA (1974)	BOUZNAD (1978)		HOFFMAN et TURNER (1982)
	in vivo	in vitro	in vitro	in vivo	in vitro	in vitro
<u>Cellulose (CX)</u>	N	0				
<u>Hemicellulases</u>						
+ arabinase	+	0				
+ xylosidase						
<u>Pectinases</u>						
+ polygalacturonases				+	+	+
+ polyméthylgalacturonases				+	+	+
+ polyméthylesterases +						
+ α galactosidase				0	+	+
+ β galactosidase				N	+	
+ β glucosidase				N	+	+
+ α glucosidase				N	N	
<u>Protease</u>						
+ Aminopeptidase			+	N	+	
<u>Amylase</u>			+			
<u>Phosphatase</u>				+	+	
<u>Invertase</u>			+			

Légendes: + présence forte activité
0 absence activité
N activité très faible

On a aussi montré la sécrétion d'une toxine non spécifique: l'ascochitine. Cette substance antibiotique a été isolée, décrite et caractérisée à partir de filtrats de culture d'*A. pisi* par (BERTINI, 1956) et par OKU et MAKANISHI (1963) à partir de filtrats de culture d'*A. fabae*.

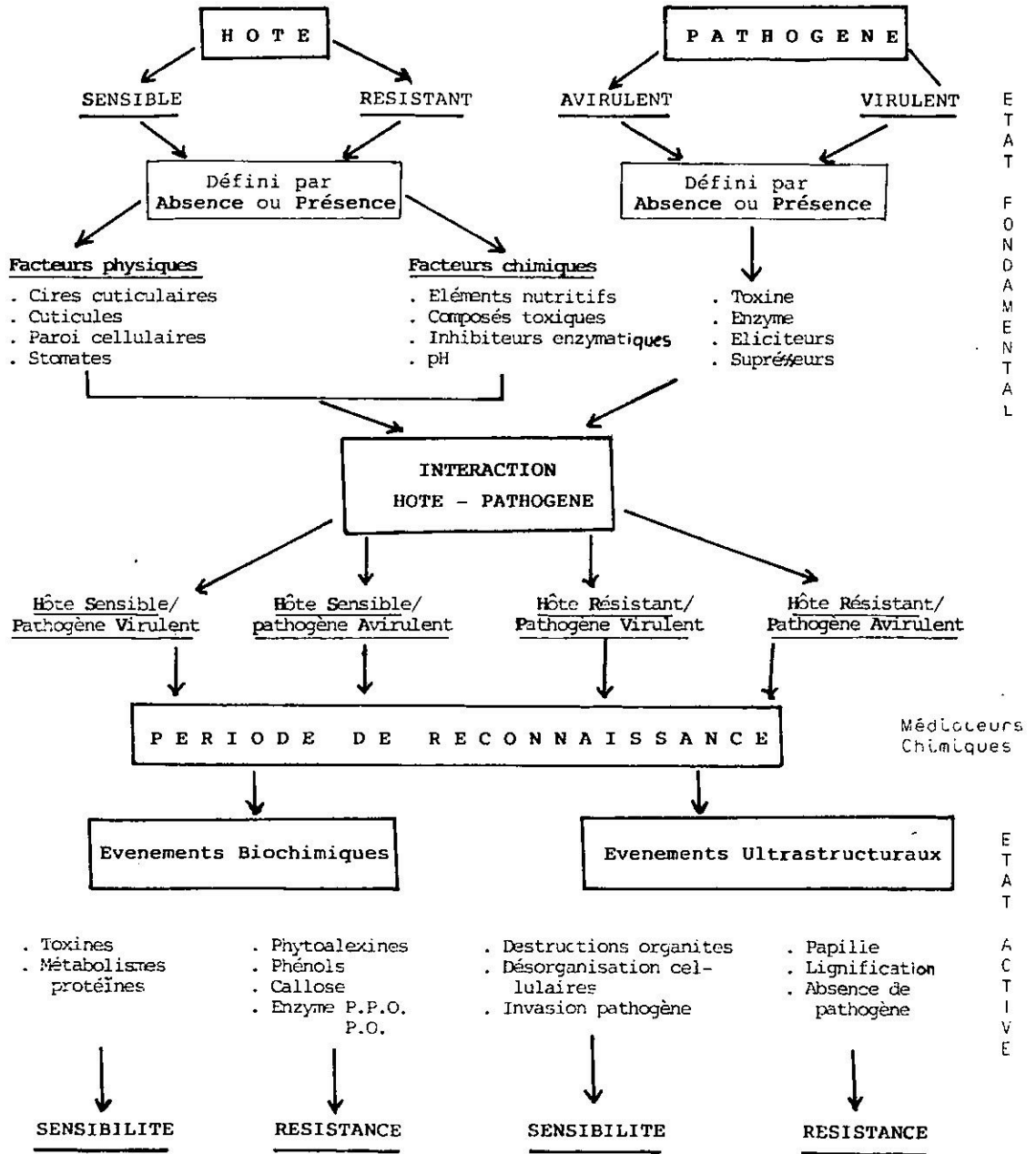
Par la suite, Le POIVRE (1981 et 1982) a établi une corrélation entre la production de cette toxine, l'agressivité du parasite et la sensibilité de quelques cultivars de Pois. Nous avons également, en collaboration avec ALLARD (travaux non publiés), obtenu des extraits d'ascochitine à partir d'une culture agitée d'*A. fabae* et *A. pisi*.

Si dans le couple *P. sativum* / *A. pisi* de nombreux processus biochimiques ont été précisés, en revanche les évènements morphologiques qui accompagnent l'interaction hôte-parasite n'ont pas fait l'objet d'études très détaillées en ce qui concerne l'ultrastructure et la cytochimie.

Pour beaucoup d'autres pathogènes, des données ultrastructurales sur les mécanismes de sensibilité ou de résistance sont connues en particulier pour les biotrophes obligatoires (idiums, mildious et rouilles), (ELLINGBOE, 1966; STAVELEY et al., 1969; BENADA, 1970; MONT et SKESINSKI, 1971; INGRAM, 1976; KUNOH, 1978 et 1981; CONTI et al., 1985).

Parmi les hémibiotrophes, c'est principalement le genre *Colletotrichum* et plus précisément, *C. lindemuthianum* agent de l'antracnose du Haricot a été le plus étudié (PARBERY et MERCIER, 1971; ALLARD, 1971; MERCIER et WOOD, 1971; O'CONNELL, 1985). De très nombreux parasites sont par ailleurs nécrotrophes ou biotrophes (MESSIAEN, 1981). L'un des objectifs de notre travail est aussi de déterminer de ce point de vue la position de l'*A. pisi*, en précisant les évènements morphologiques et biochimiques (cf. Fig. 4) tels que définis par de nombreux auteurs (AKAI et OUCHI, 1973; WHEELER, 1975; HEITEFUSS, 1981; MISAGHI, 1982; MANSFIELD et HEATH, 1982; HEATH, 1982 (b)).

Fig. 4: Schéma des évènements morphologiques (ultrastructuraux) et biochimiques conduisant à une sensibilité ou une résistance dans une interaction hôte-pathogène.



Toutes ces données montrent que lors de l'infection des plantes par un pathogène d'origine fongique, l'hôte développe toujours un système de défense très diversifié. Les phénomènes qui se succèdent dès l'arrivée du pathogène au niveau de la plante, aboutissent ou non à l'établissement de la maladie. Ainsi, s'il y a compatibilité avec l'hôte, il y aura infection, tandis qu'en cas d'incompatibilité le pathogène est arrêté ou éliminé à des stades différents de la tentative d'infection.

1.5. OBJET DE NOS RECHERCHES

L'analyse des travaux précédemment exposés, fait ressortir deux centres d'intérêt: les anthracoses des Légumineuses d'une manière générale et celle du Pois causée par *A. pisi*, en particulier.

L'étude systématique des anthracoses sur Légumineuses a été motivée par la grande hétérogénéité morphologique et culturale des espèces fongiques impliquées et par la confusion qui règne dans la détermination de certaines espèces, voire même entre genres.

D'autre part, malgré les nombreux travaux réalisés sur *A. pisi* agent principal de l'anthracose du Pois, très peu de recherches ont été consacrées à la biologie du pathogène et aux interactions entre le champignon et son hôte.

A cet effet, nous avons tenté, dans une première partie, de clarifier la systématique du genre *Ascochyta* inféodé aux Légumineuses cultivées. Nous avons procédé en trois étapes:

- . Caractérisation morphologique et culturale des différentes espèces retenues dans notre étude;
- . Examen détaillé de la conidiogenèse en microscopie photographique et électronique. Cette dernière approche est en effet de plus en plus considérée dans la taxonomie des champignons.
- . Inoculations croisées pour préciser le degré de spécificité des espèces fongiques vis-à-vis des Légumineuses.

Cette étude nous paraît fondamentale pour une bonne identification de l'espèce.

Dans la deuxième partie de notre étude, certains aspects biologiques et pathologiques d'*A. pisii* ont été étudiés.

Les exigences du champignon tout d'abord ont été redéfinies en étudiant *in vitro* l'action de la température sur la germination, la croissance et la sporulation. Comme *A. pisii* est essentiellement transmis par les semences, nous avons tenu à préciser les facteurs essentiels de la transmission du champignon de la graine à la plantule. Ce travail a été mené soit à partir de graines naturellement infectées, soit à partir de graines artificiellement inoculées.

Ensuite, la variabilité du pouvoir pathogène de cette espèce a été déterminée en utilisant une gamme d'hôtes différentiels assez large pour permettre l'identification des races physiologiques (pathotypes). Cette étude a porté sur un matériel fongique de provenances géographiques très diverses.

La dernière partie du présent travail a été consacrée aux aspects ultra-structuraux et cytochimiques des relations *P. sativum* / *A. pisii*.

Ce travail a été mené en deux étapes:

- (1)- Les premiers stades du processus infectieux, allant de la germination des spores à la surface de l'hôte, jusqu'à la pénétration effective du champignon, ont tout d'abord été précisés en microscopie électronique à balayage (M.E.B.).

(2)- Les stades ultérieurs après la pénétration jusqu'à la formation de la nécrose ont été étudiés au niveau ultrastructural et cytochimique sur des hôtes sensibles et résistants.

Ainsi, certains éléments de la résistance du Pois (*Pisum sativum*) à l'antracnose causée par *A. pisi* seront mieux définis pour un éventuel programme d'amélioration de cette culture vis-à-vis de cette maladie.

2. MATERIEL ET TECHNIQUES

2.1. PLANTES HOTES UTILISEES

2.1.1. CHOIX DES ESPECES ET DES CULTIVARS

Pour l'ensemble de nos manipulations, les cultivars de Pois suivants ont été retenus :

- Cultivars résistants :

- . Rondo
- . Finale

- Cultivars sensibles :

- . Merveille de Kelvedon
- . Douce de Provence
- . Frisson

Pour les tests d'inoculation croisée entre les différentes espèces d'*Ascochyta* et leurs hôtes respectifs, les espèces hôtes suivantes ont été utilisées :

- . Vesce (*Vicia sativa*), population sauvage;
- . Gesse (*Lathyrus ochrus*), population sauvage;
- . Fève (*Vicia faba*), cultivar Aguadulce;
- . Haricot (*Phaseolus vulgaris*), cultivar Contender;
- . Lentille (*Lens culinaris*), cultivar Saïda;
- . Pois chiche (*Cicer arietinum*), cultivar Rabat 9.

Le matériel ayant servi à la détermination des races physiologiques est précisé dans le paragraphe se rapportant à cette étude (cf. Fig. 9).

2.1.2. MODALITES ET CONDITIONS D'OBTENTION DES PLANTULES

L'obtention des plantules de Pois ne présente pas de difficulté particulière. Néanmoins, afin d'améliorer le pourcentage de germination, les graines subissent une pré-germination entre deux feuilles de papier filtre imbibées d'eau, disposées dans une terrine et maintenues pendant 24h. à la température ambiante du laboratoire (16° à 22°C). Les graines germées sont ensuite repiquées selon les méthodes suivantes:

- EN_TERRINE: C'est la technique qui a été la plus employée pour la production de plants destinés soit à être inoculés directement en terrine, soit à permettre le prélèvement de folioles pour l'expérimentation en conditions de survie.

Pour l'obtention d'épicotyles après germination, les graines sont semées dans des terrines contenant de la vermiculite et maintenues à l'obscurité. Au fur et à mesure du développement des plantules, de la vermiculite est ajoutée pour obtenir l'élongation des épicotyles.

- SUR_GRILLAGE_PLASTIQUE: Cette méthode consiste à déposer les graines de Pois sur un grillage et à les maintenir à moitié immergées dans de l'eau contenue dans un cristalliseur. Cette technique utilisée par VO THI (1976) permet d'obtenir un pourcentage plus élevé de plantes saines (indemnes d'A. pisi) et un meilleur état de propreté des folioles destinées aux études microscopiques. Le seul inconvénient de cette technique réside dans la nécessité de maintenir ces graines en demi-immersion en réajustant constamment le niveau de l'eau.

2.2. MATERIEL FONGIQUE ETUDIE

La diversité des aspects étudiés dans ce travail (morphologie et ontogénie des spores, races physiologiques, transmission de la maladie par la graine, relations hôte-parasite), nous a amené à utiliser de nombreux isolats d'*A. pisi* (Tab. 2) ainsi que de nombreuses autres espèces d'*Ascochyta* (Tab. 3).

Le tableau 2 concerne uniquement les isolats d'*A. pisi* et le tableau 3 présente les différentes espèces d'*Ascochyta* isolées à partir des autres légumineuses cultivées et spontanées. Pour désigner les isolats, le nom de l'espèce est suivi soit par les initiales du lieu géographique où elle a été obtenue, soit par celles de la plante hôte.

2.2.1. PURIFICATION DES ESPECES ET ISOLATS PAR CULTURE MONOSPORE

Au cours des isolements, les colonies d'*Ascochyta* sp sont souvent, soit en mélange avec d'autres champignons voisins (cas des *A. pisi*, *A. pinodes* et *A. pinodella*), soit contaminées par des bactéries. Aussi, avant de mettre une quelconque souche dans notre collection, une purification a été réalisée par des repiquages successifs en boîtes de Pétri. Afin d'obtenir une population homogène répondant à la définition de l'isolat selon BOMPEIX et COLENO (1984), la purification a été obtenue par culture monospore. Toute ces étapes sont résumées par le schéma de la figure 5 .

TABLEAU 2 : DIFFERENTS ISOLATS D'*Ascochyta pisi* UTILISES

ISOLATS	ORGANE D'ISOLEMENT	ORIGINE GEOGRAPHIQUE
A. pisi (Collo)	Foliole	Collo (Algérie)
A. pisi (Mou.)	Gousses	Mouzaïa (Algérie)
A. pisi (EA ₂₃)	Gousses	El-Anasser (Algérie)
A. pisi (BS)	Semences importées	Hollande
A. pisi (DP ₁₂)	Semences importées	Angleterre
A. pisi (EA ₂)	Gousses	El-Khemis (Algérie)
A. pisi (AL ₂ N°4)		Versailles (France)
A. pisi (GIR)	Semences	Gironde (France)
A. pisi (10908)	Semences	Laminière (France)
A. pisi (L/G)	Semences	Lot et Garonne (France)
A. pisi (Tezier)	Plantules	Versailles (France)

Tableau 3 : DIFFERENTES ESPECES D'Ascochyta
DES LEGUMINEUSES UTILISEES

ESPECE	PLANTE-HOTE	ORGANE D'ISOLEMENT	ORIGINE GEOGRAPHIQUE
A. fabae (SOU.)	Fève = (<i>Vicia faba</i>)	Gousses	El-Anasser (Alger)
A. fabae (LAM.)	"	Semences	Laminière (Versailles)
A. rabiei (MAROC)	Pois chiches = (<i>Cicer arietinum</i>)	Semences	Maroc
A. phaseolorum	Haricot = (<i>Phaseo- lus vulgaris</i>)	Semences	Annaba (Algérie)
A. Vicia (COLLO)	Vesce = (<i>Vicia sativa</i>)	Gousses	Collo (Algérie)
A. lentis	Lentilles = (<i>Lens culinaris</i>)	Tiges	Sidi el Abbes (Algérie)
A. lathyri	Gesse = (<i>Lathyrus tingitanus</i>)	Gousses	Figuier (Algérie)
A. sp. (<i>Lathyrus OCH.</i>)	(<i>Lathyrus ochrus</i>)	Gousses	Figuier (Algérie)
A. sp. (tg ₁)	(<i>Lathyrus tingi- tanus</i>) tige	Tiges	Alger
A. pinodes (122)	Pois = (<i>Pisum sativum</i>)	Collection ALLARD (Versailles)	
A. pinodella	Pois = (<i>Pisum sativum</i>)	Semences	Annaba (Algérie)

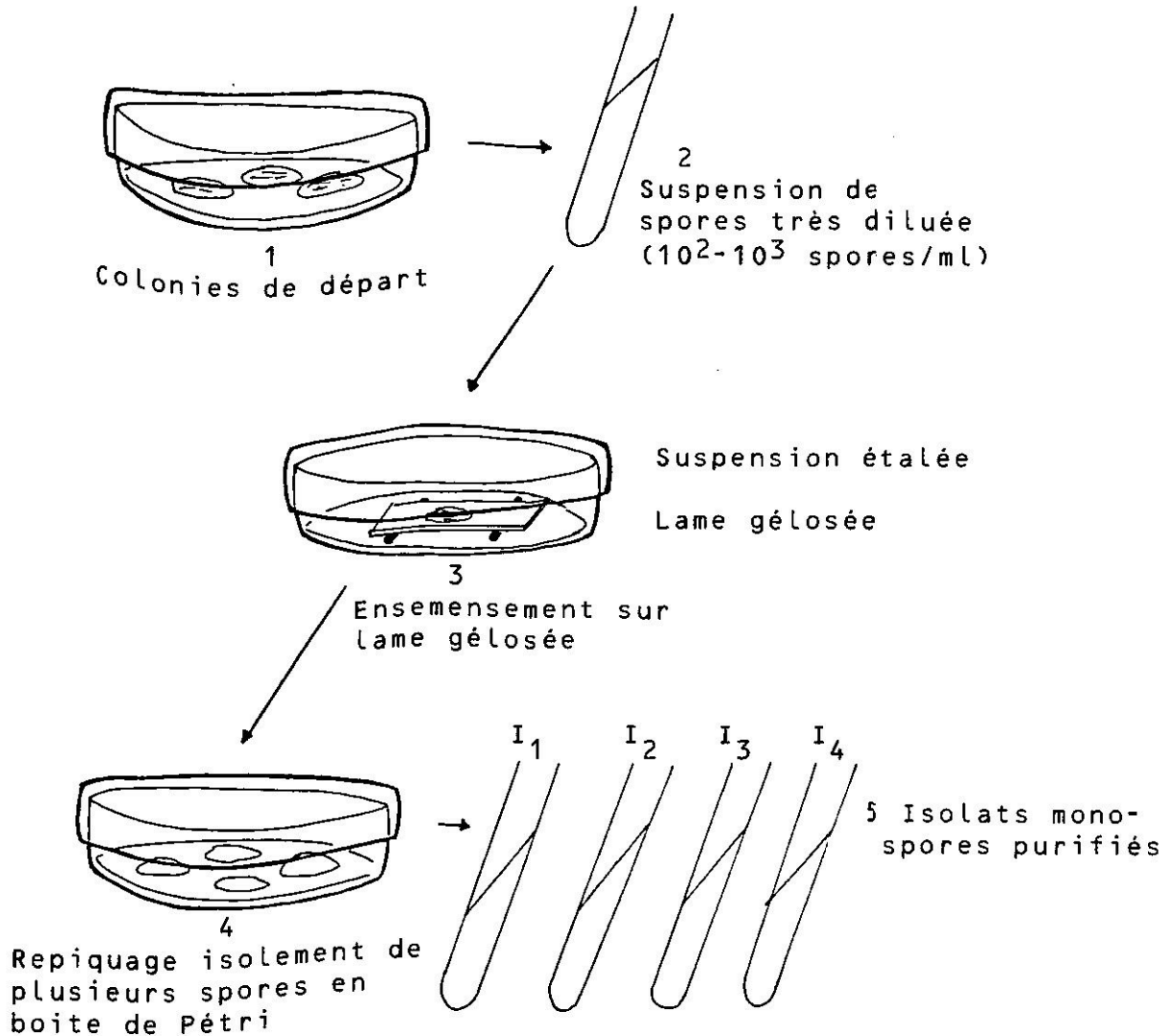


Fig. 5: Schéma de purification monospore

d'une manière générale, une culture monospore peut être réalisée soit à partir d'une suspension diluée de spores, soit à partir de l'apex d'un mycélium quand le champignon ne fructifie pas (RAPILLY, 1968).

Dans notre cas, la combinaison des deux méthodes a été utilisée. Une suspension de pycniospores très diluée (10^2 à 10^3 spores/ml) est étalée sur une lame recouverte d'une mince couche de milieu gélosé. Afin d'éviter toute contamination, cette lame est disposée à l'intérieur d'une boîte de

Pétri en verre stérile (Fig.5). Après 12 à 16 heures d'incubation à 20°C - 22°C, c'est-à-dire lorsque les tubes germinatifs émis mesurent au moins deux fois la longueur des spores, un fragment de gélose, supportant une spore unique en voie de germination, est prélevée puis repiquée dans une boîte de Pétri contenant le milieu de culture MATHUR et al. (1950).

Après 5 à 7 jours de croissance et lorsque le diamètre de la colonie est suffisamment important, un repiquage en tube à essai est effectué. Il permet d'obtenir un isolat homogène.

2.2.2. CONSERVATION DES ISOLATS ET MAINTIEN DE LEUR POUVOIR PATHOGENE

Nous expériences ayant porté sur plusieurs années, certaines précautions s'imposaient pour conserver les isolats et éviter une perte de leur pouvoir pathogène par vieillissement en culture artificielle. A cet effet, les cultures pures repiquées en tubes à essais ont été maintenues constamment en chambre froide (4° - 5°C). De plus, au moins une fois par an, les isolats ont été inoculés sur une plante hôte.

2.3. ETUDE DES CARACTERES MORPHOLOGIQUES DES *Ascochyta* spp.

La caractérisation morphologique des différents isolats d'*Ascochyta* spp. a été réalisée par mesure de la longueur et du diamètre des spores. Celle-ci a été

effectuée au microscope à partir d'une suspension de spores homogène, préparée dans de l'eau stérile. Pour chaque espèce l'estimation est une moyenne établie à partir d'au moins 100 spores.

Des informations complémentaires ont été obtenues par la mesure des dimensions des pycnides, la présence ou l'absence de chlamydo-spores, le type de spores (mono, bi ou pluricellulaires), ainsi que l'aspect général des colonies selon les milieux de culture.

A partir de ces données, des classes d'isolats ont été définies afin d'apprécier le niveau de similitude entre les différentes espèces.

2.4. ETUDE DES CARACTERES ONTOGENIQUES

Pour beaucoup d'espèces fongiques, la microscopie photonique suffit à elle seule pour distinguer certains détails des cellules sporogènes, présentant un intérêt taxonomique. C'est le cas de la formation annellidique du conidiophore chez les espèces appartenant aux genres *Spilococeae*, *Scorulariopsis* et *Anellophora* (HUGHES, 1953; COLE et SAMSON, 1979).

Concernant le genre *Ascochyta*, les descriptions ontogéniques habituellement rapportées sur ces formations et comparées le plus souvent avec celles du genre *Phoma* (SUTTON et SANDHU, 1968; BREWER et BOEREMA, 1965; BOEREMA et BOLLEN, 1975; USPENKOZOVA et al., 1976), ne sont pas évidentes. Ces incertitudes nous ont amené à reprendre l'étude de la conidiogenèse sur un plus grand nombre d'espèces; certaines ayant parfois des origines géographiques très différentes.

Tous les stades de la morphogenèse de la pycnide et de la libération des pycnidiospores ont été étudiés en microscopie photonique et électronique. Pour cette approche, le matériel fongique a subi les mêmes méthodes générales de préparation et de fixation que celles utilisées par différents auteurs (JOHNES, 1976; BOEREMA et BOLLEN, 1975; HANLIN, 1976; HAMMILL, 1974 et 1977; COLE, 1981).

Les pycnides sont obtenues en boîtes de Pétri sur le milieu MATHUR, puis prélevées par petits blocs de gélose lorsque une grande proportion de ces pycnides ont produit plusieurs générations de spores. Les prélèvements sont réalisés de telle sorte que l'on ait aussi des pycnides en début de formation.

Ayant utilisé la procédure de fixation préconisée pour l'étude des relations hôte-parasite décrite au paragraphe (2.7.), le tableau 4 résume l'essentiel des étapes avec les traitements spécifiques au matériel fongique étudié (osmolarité, pH, durée de l'incubation et des rinçages, température, etc...).

Enfin, rappelons que cette étude a porté sur les isolats suivants: *A. pisi* (COLLO), *A. pisi* AL₂ N°4), *A. pinodes* (122 m), *A. pinodes* (D.P.), *A. pinodella* (ANNABA), *A. viciae* (COLLO), *A. viciae* (BOU ISMAIL), *A. lathyri* (OCH), *A. lathyri* (tg₁), *A. phaseolorum*, *A. rabiei* (MAROC), *A. fabae* (LAM.) et *A. lentis* (S.N.A.).

L'étude de la pycnidiogenèse réalisée en microscopie photonique à partir de coupes semi-fine a été complétée par un examen du comportement nucléaire.

Tableau 4 : RECAPITULATIF DES PRINCIPALES ETAPES DE LA
FIXATION DES PYCNIDES

ETAPES	CONDITIONS DE FIXATION
1. Pré-fixation dans glutaraldéhyde	<ul style="list-style-type: none">. Le mélange fixateur est constitué par: 1 vol. gluta 6%1 vol. vecteur { - Tampon cacodylate 0,05M pH 7,2 1 vol. - Additif saccharose 0,1M 1 vol.. L'osmolarité finale est + CaCl_2 ajustée à 200 m Osmoles. La fixation est réalisée à la température de la glace fondante et dure 2 h.. Rinçage dans le même tampon, à la même osmolarité: 0,2M.
2. Post-fixation dans tétroxyde d'osmium	<ul style="list-style-type: none">. Le mélange fixateur est constitué par:1 vol. tétroxyde d'osmium à 2%1 vol. { - Tampon cacodylate 0,05M pH=7,2 1 vol. - Additif saccharose 0,1M 1 vol.. La fixation se déroule à la température ambiante (20°C) et dure 2 h.. Rinçage dans de l'eau distillée filtrée
3. Coloration sur bloc à l'acétate d'uranyle	<ul style="list-style-type: none">. Les spécimen subissent une coloration sur bloc dans une solution d'acétate d'uranyle à 2 % dans de l'eau, pendant 45 mn.. Rinçage dans de l'eau distillée filtrée.
4. Déshydratation	<ul style="list-style-type: none">. Passage progressif dans des bains d'éthanol 50°: 5mn; 70° : 5 mn; 95° : 7 mn; 100° : 7 mn; 100° : 10 mn.. Puis 3 bains d'oxyde de propylène de 5 à 7 mn chacun
5. Substitution	<ul style="list-style-type: none">. Remplacement progressif de l'oxyde de propylène par la résine pure. Les bains durent 1h 30 chacun.
6. Imprégnation	<ul style="list-style-type: none">. 3 bains dans résine pure à l'étuve sous vide de 1h 30 chacun.
7. Inclusion	<ul style="list-style-type: none">. Dans résine pure "DURCUPAN" à l'étuve réglée à 45°C pendant 12 heures puis à 60°C pendant 72 h.

D'une manière générale, la coloration nucléaire sur matériel fongique (ROBINOW, 1961; COTOTELO et GRINCHENKO, 1962; CRAIGIE et GREEN, 1962; DJERBI et al., 1974; ANDO et KATSUTA, 1984) comprend les étapes suivantes:

- Fixation par un ou plusieurs mélanges de fixateurs (alcool, acide acétique, acide chromique, acide lactique)
- Hydrolyse acide par acide chlorhydrique 5N
- Coloration de la chromatine par le colorant de GIEMSA
- Différenciation par un tampon.

Cependant, dans le détail, les techniques employées diffèrent d'un auteur à l'autre, en fonction des espèces de champignons.

Dans notre cas, après avoir testé plusieurs techniques, la méthode de COLOTELO et GRINCHENKO (1962) a été retenue. Une autre technique plus simple a été adaptée à notre matériel fongique à partir de celle décrite par DJERBI et al. (1974).

Le tableau 5 résume les différentes étapes des techniques de coloration nucléaire utilisées.

2.5. ETUDE *in vitro* DE QUELQUES CARACTERES BIOLOGIQUES D'*Ascochyta pisi*

De nombreuses espèces fongiques ont des exigences générales identiques ou très proches, mais chaque espèce ne manifeste une croissance et une sporulation optimales que dans des conditions très particulières.

Tableau 5 : RECAPITULATIF DES ETAPES DE LA COLORATION NUCLEAIRE

ETAPES	SELON METHODE DE COLOTELO ET GRINCHENKO (1962)	SELON METHODE MODIFIEE DE DJERBI <u>et al.</u> , 1974
1. Les spores sont collées sur lames par mélange de Haupt		
2. Fixation	Mélange fixateur: alcool absolu 4 vol. acide lactique 1 vol. acide acétique 5 vol. pendant 10 mn	Mélange fixateur alcool 95° pendant 7 à 10 mn
3. Déshydratation	Ethanol 95° 10 ^{sec.} 75° 10 sec.	
4. Rinçage	H ₂ O 15 sec.	H ₂ O.
5. Hydrolyse acide	HCl 5 N 5 mn à froid 5 mn à 60° (étuve)	HCl 5 N à température ambiante (20°C 10 à 15 mn)
6. Rinçage	H ₂ O 5 mn.	H ₂ O 5 mn.
7. Tampon phosphat e pH 7,2	5 mn.	-
8. Coloration GIEMSA	30 à 60 mn	1h30 à 2 h.
9. Rinçage	H ₂ O 5 sec.	-
10. Tampon phosphat e pH : 7,2	5 sec.	7 à 10 mn.
11. Montage pour observation	Glycérine	Glycérine 50% dans H ₂ O

Celles-ci sont surtout déterminées par la qualité et la quantité des éléments nutritifs présents dans le milieu de culture (MOREAU, 1953). Cependant, ces facteurs biotiques restent très influencés par les facteurs abiotiques (température, lumière, pH, etc...).

2.5.1. MILIEUX DE CULTURES

Pour toutes les espèces fongiques, le choix d'un milieu de culture dépend des exigences nutritionnelles du champignon (NEERGARD, 1973). Pour les espèces d'*Ascochyta* spp., le problème se pose différemment puisqu'elles peuvent se développer sur une large gamme de milieux organiques, minéraux ou semi-organiques. Cependant, la sporulation que nous nous proposons d'étudier varie d'un milieu à un autre.

Un certain nombre de milieux couramment utilisés en phytopathologie (milieu Malt, P.D.A., Czapeck) ainsi que celui mis au point par MATHUR et al. (1950) pour le *Colletotrichum Lindemuthianum*, ont été utilisés.

La composition respective de chacun des milieux expérimentés est rappelée ci-dessous:

- Milieu semi-organique - Milieu Mathur

. Peptone	1.50 g
. Extrait de levure	0.50 g
. Glucose	2.80 g
. Mg SO ₄ 7H ₂ O	1.23 g
. KH₂PO₄ Agar	20.00 g
. Eau distillée	1000 ml
. KH ₂ PO ₄	2,72 gr

- Milieu organique : Malt
 - . Extrait de Malt 20.0 g
 - . Gélose 20.0 g
 - . Eau distillée 1000 ml

- Milieu minéral : Milieu Czapeck
 - . Na NO₃ 2.0 g
 - . K₂ H PO₄ 1.0 g
 - . KCl 0.5 g
 - . Mg SO₄ 7 H₂O 0.5 g
 - . Fe SO₄ 7 H₂O 30.0 g
 - . Saccharose 15.0 g
 - . Eau distillée 1000 ml

- Milieu organique: P.D.A.

Il est préparé soit à partir du P.D.A. commercial (DIFCO), soit fraîchement préparé en utilisant des pommes de terre. Dans ce dernier cas, 250g de pommes de terre sont épluchées et mises à cuire dans 1 l d'eau distillée.

Au filtrat de cuisson récupéré est ajouté:

- . 10 g de Dextrose
- . 20 g de Gélose (Agar-Agar).

La stérilisation s'effectue comme pour tous les autres milieux, c'est-à-dire à l'autoclave réglée à 120° pendant 20 minutes.

2.5.2. EVALUATION DE LA CROISSANCE MYCELIENNE ET DE LA SPORULATION

Selon qu'il s'agit d'une culture de champignon en milieu solide ou liquide, l'appréciation de la croissance mycélienne est obtenue soit par la croissance linéaire de la colonie soit par la mesure du poids sec. Seule la première technique a été retenue où l'estimation de la croissance mycélienne est alors obtenue en appliquant la formule proposée par BOMPEIX (1972).

$$L = \frac{D - d}{2}$$

avec L = croissance mycélienne
D = diamètre de la colonie
d = diamètre de l'explantat qui a servi
au repiquage

Pour mesurer la sporulation du champignon, l'évaluation de la quantité de spores est obtenue selon la technique utilisée par BOMPEIX (1974). Elle consiste à hydrolyser la culture en ajoutant 5 ml d'acide acétique $\frac{N}{5}$ et en maintenant l'ensemble au bain-marie bouillant pendant 30 minutes. La suspension contenant les Pycnides est broyée à l'aide d'un broyeur Virtix. Après filtration grossière sur filtre nylon (50 - 70 μ m) sous pression d'air (appareil type Sartorius), la quantité de spores par ml est évaluée à la cellule de Malassez.

2.5.3. TECHNIQUES D'ETUDE DE LA GERMINATION DES SPORES

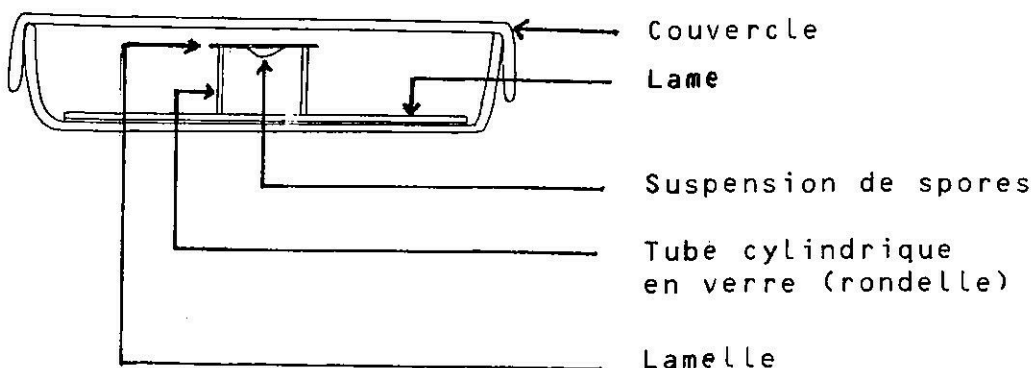
L'étude de la germination des spores, premier stade de développement des champignons, représente un préalable à toute étude de la biologie d'un pathogène ou du processus infectieux.

Au cours de nos recherches, la germination des spores a été étudiée selon trois méthodes différentes :

- En goutte pendante: Celle-ci est réalisée selon la technique décrite par COCHRANE (1958); ZARACOVITCH (1966), RAPILLY (1968) et DJERBI (1978).

En pratique, la cellule type de VAN THIEGHEM est réalisée avec une rondelle en plastique ou en verre, de 12 mm de diamètre et d'une hauteur de 15 mm collée sur une lame porte-objet (Fig. 6). Pour obtenir une chambre relativement hermétique (afin de limiter l'évaporation) un anneau de pâte à modeler sur lequel est appliqué un peu d'huile de paraffine ou d'huile à immersion, est utilisé.

Fig. 6: Dispositif de réalisation d'une goutte pendante pour l'étude de la germination *in vitro* des spores.

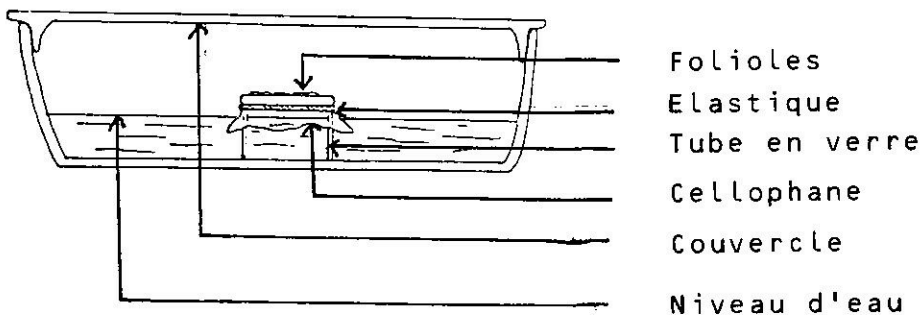


La goutte pendante est réalisée à partir d'une suspension de spores (10^6 spores/ml) déposée sur une lamelle dégraissée afin d'éviter l'étalement de la goutte. La lamelle est ensuite retournée avec précaution, puis posée sur l'anneau. L'ensemble du dispositif est incubé dans une enceinte à humidité saturante.

- Sur lame gélosée: Cette technique, initialement utilisée pour tester les fongicides (GATTANI, 1953), permet d'obtenir une répartition plus homogène des spores. Elle consiste à utiliser des lames porte-objet sur lesquelles est étalée une fine couche de milieu gélosé. Ces lames sont disposées au préalable sur un support en verre à l'intérieur de boîtes de Pétri en pyrex, puis l'ensemble est stérilisé au four Pasteur. Le milieu est coulé aseptiquement sur la lame. Après solidification, une goutte de suspension de spores (10^6 spores/ml) est étalée et l'ensemble est mis à incuber.

- Sur support de cellophane: Cette technique, légèrement modifiée, a été déjà utilisée par RAPILLY et SKAJENNIKOFF, (1974).

Fig. 7: Dispositif d'incubation du matériel végétal (folioles) sur cellophane.



Une feuille de cellophane est disposée sur un anneau de verre (Fig.7), l'ensemble est introduit dans une enceinte à humidité saturante. Les bords du support en cellophane plongent dans l'eau, ce qui permet de maintenir une certaine humidité au niveau de la suspension de spores.

EXPRESSION DE LA GERMINATION

Selon les objectifs visés, les critères de notation peuvent varier, mais d'une manière générale l'expression de la germination d'une suspension de spores est donnée par le pourcentage de spores ayant germé pendant un certain temps d'incubation.

La société américaine de phytopathologie (1943) considère arbitrairement qu'une spore est germée quand la longueur du tube germinatif dépasse la moitié du petit diamètre de la spore.

Mais pour une meilleure appréciation de l'activité physiologique de la spore, certains auteurs (COCHRANE, 1958; MANNERS, 1966) considèrent également l'importance de la croissance du tube germinatif.

A cet effet, dans l'étude de la germination des spores de l'*Ascochyta pisi*, nous avons retenu, comme critère de notation, le pourcentage de spores ayant émis un tube germinatif ainsi que la croissance de celui-ci au cours du temps.

2.6. ETUDE DE LA VARIABILITE DU POUVOIR
PATHOGENE DES *Ascochyta* spp.

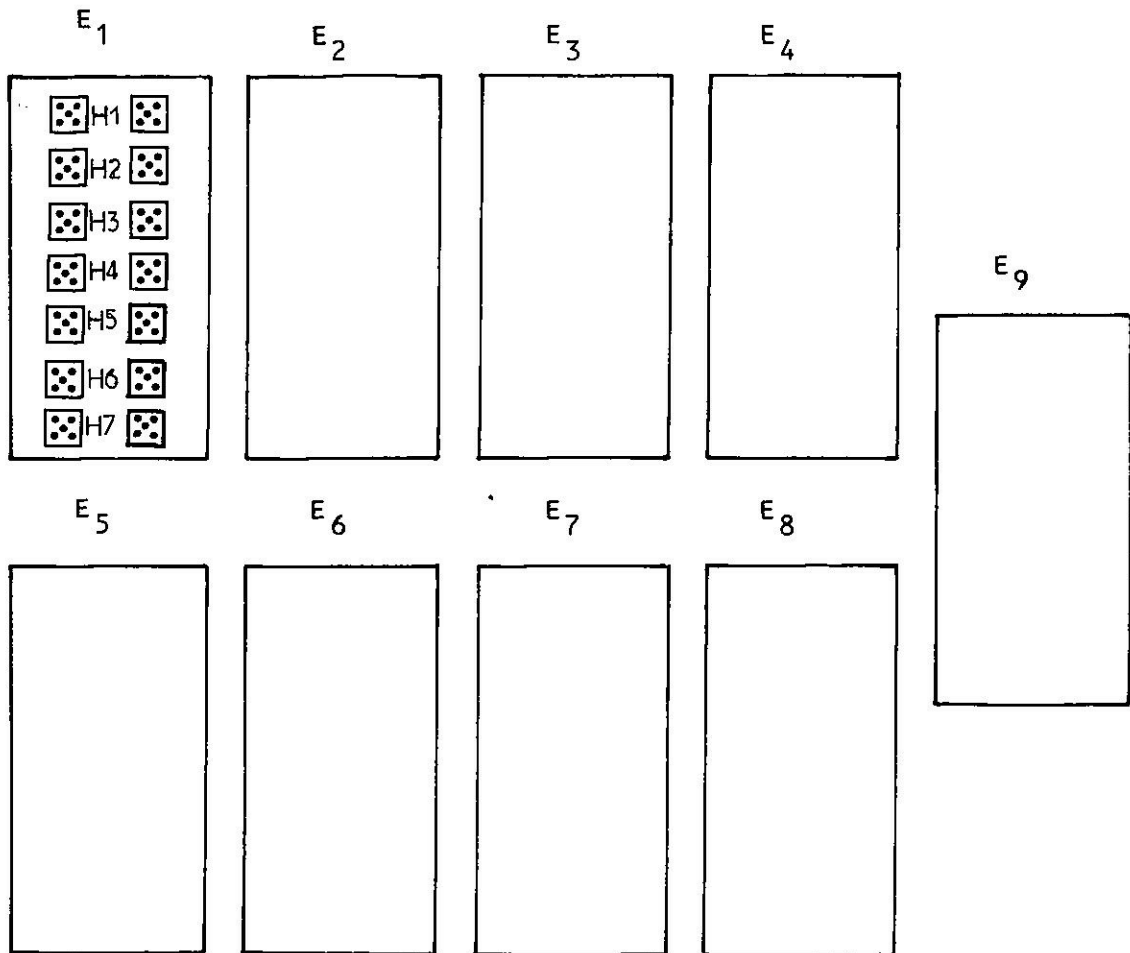
Afin d'estimer la variabilité du pouvoir pathogène des isolats d'*Ascochyta pisi* ainsi que la spécificité parasitaire des autres espèces d'*Ascochyta* spp au niveau des légumineuses, trois types d'expérimentation ont été pratiqués.

2.6.1. METHODE D'APPROCHE POUR L'ETUDE
DE LA SPECIFICITE PARASITAIRE

Dans cette étude, nous avons procédé à des inoculations artificielles croisées sur plantules obtenues en serre (voir paragraphe 2.7.2.) selon le dispositif présenté par la figure 8 . Chacune des espèces: *A. pisi*, *A. pinodes*, *A. pinodella*, *A. fabae*, *A. rabiei*, *A. lentis*, *A. phaseolorum*, *A. viciae* et *A. lathyri* est inoculée sur l'ensemble des légumineuses ci-dessous: (*Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Cicer arietinum*, *Lens culinaris*, *Phaseolus vulgaris*, *Vicia sativa* et *Lathyrus ochrus*).

L'expérimentation porte sur deux terrines de 10 plantes chacune, soit un total de 20 plantes et la notation est exprimée par le passage ou non du pathogène au niveau des plantules, c'est-à-dire s'il y a ou non apparition de symptômes typiques de la maladie.

Fig. 8: Dispositif expérimental pour les inoculations croisées par les différentes espèces d'*Ascochyta* spp. sur les différentes légumineuses



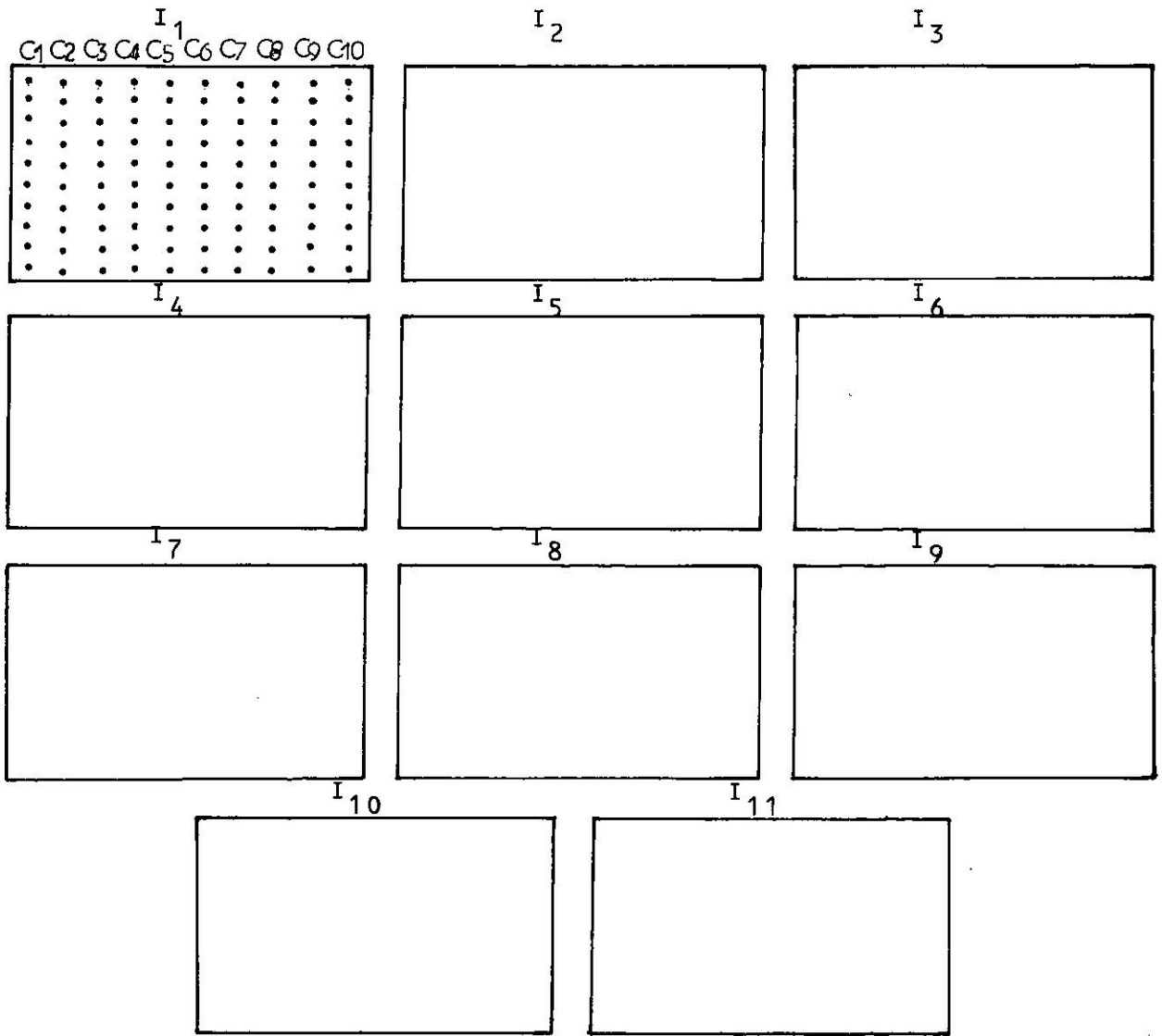
Espèces d'*Ascochyta*

- E₁ : *A. pisi*
- E₂ : *A. pinodes*
- E₃ : *A. pinodella*
- E₄ : *A. fabae*
- E₅ : *A. viciae*
- E₆ : *A. rabiei*
- E₇ : *A. phaseolorum*
- E₈ : *A. lathyrì*
- E₉ : *A. lentis*

Plantes hôtes légumineuses

- H₁ : *Pisum sativum*
- H₂ : *Vicia fabae*
- H₃ : *Cicer arietinum*
- H₄ : *Lens culinaris*
- H₅ : *Phaseolus vulgaris*
- H₆ : *Vicia sativa*
- H₇ : *Lathyrus ochrus*

Fig. 9: Dispositif expérimental pour l'étude des races physiologiques d'*Ascochyta pisi*.



Isolats d'*Ascochyta pisi*

- | | |
|---|---|
| I ₁ : <i>A. pisi</i> (BS) | I ₇ : <i>A. pisi</i> (AL ₂ N 4) |
| I ₂ : <i>A. pisi</i> (Collo) | I ₈ : <i>A. pisi</i> (Tezier) |
| I ₃ : <i>A. pisi</i> (DP ₁₂) | I ₉ : <i>A. pisi</i> (10908) |
| I ₄ : <i>A. pisi</i> (MOU.) | I ₁₀ : <i>A. pisi</i> (LG) |
| I ₅ : <i>A. pisi</i> (EA ₂₃) | I ₁₁ : <i>A. pisi</i> (EK ₂) |
| I ₆ : <i>A. pisi</i> (GIR) | |

Cultivars utilisés

- | | |
|-----------------------------|------------------------------|
| C ₁ : Arabal | C ₆ : M. Kelvedon |
| C ₂ : Cobri | C ₇ : Rondo |
| C ₃ : D. S. P. | C ₈ : Starcovert |
| C ₄ : FINALE | C ₉ : Supcovert |
| C ₅ : GUILLIVERT | C ₁₀ : Vitalis |

2.6.2. METHODE DE DETECTION ET D'IDENTIFICATION DES RACES PHYSIOLOGIQUES D'*Ascochyta pisi*

Dans la pratique phytopathologique, la connaissance de la variabilité potentielle d'un pathogène est généralement mise en évidence par la confrontation d'une collection de lignées de la plante hôte avec une collection de pathotypes du pathogène.

Selon les concepts établis par VAN DER PLANK (1968), les résultats de tels tests, montrant la présence d'une interaction différentielle de l'hôte avec le pathogène, caractérisent l'existence de races physiologiques. Ce type de démarche est illustré par les nombreux exemples rapportés par KIRALY et al. (1974).

Dans notre cas, la détermination des races physiologiques d'*Ascochyta pisi* a été réalisée selon les modalités définies par COUSIN (1972, 1984), HUBBELING (1972, 1984) et ALLARD (communication personnelle, 1984). Les 10 cultivars différentiels de Pois, utilisées par ces auteurs, ont été inoculées par les 11 isolats présentés dans le tableau 2 (cf. 2.2.1.).

L'expérimentation est conduite selon le dispositif expérimental présenté par la figure 9, dans les conditions déjà décrites au paragraphe 2.7.3.

2.6.3. ETUDE DE LA TRANSMISSION DE L'*Ascochyta pisi* EN FONCTION DU POUVOIR PATHOGENE DES ISOLATS

La transmission du pathogène par la graine a été testée sur deux cultivars de Pois, l'une sensible (cultivar Merveille de Kelvedon) et l'autre résistante

(variété finale). Les 11 isolats d'*Ascochyta pisi* ont été inoculés au niveau des graines, selon les techniques optimales décrites au paragraphe 2.7.

2.7. TECHNIQUES D'INOCULATION ARTIFICIELLE

La réussite des infections artificielles sur les différents organes du Pois (*Pisum sativum*) n'a pas toujours été assurée. De nombreuses tentatives d'inoculation ont échoué sans en avoir pu identifier les raisons. Ces échecs nous ont amené à mettre au point différentes techniques en fonction des exigences biologiques du champignon.

Les conditions de production et de préparation de l'inoculum ont été relativement constantes au cours de toutes nos inoculations. En revanche, les conditions d'incubation après les inoculations ont été très variables en fonction des exigences de l'expérimentation.

2.7.1. PRODUCTION DE L'INOCULUM

L'inoculum est produit en boîtes de Pétri sur le milieu "Mathur" décrit précédemment (paragraphe 2.4.1.). Les boîtesensemencées par un explantat provenant d'une culture bien sporulée (présence de cirrhes pycnidiens), sont ensuite incubées sous lumière continue et à la température ambiante du laboratoire (18° à 22°C). Habituellement, ces conditions permettent une sporulation importante après 7 à 10 jours.

2.7.2. PREPARATION DE LA SUSPENSION D'INOCULUM

Pour toutes les inoculations artificielles, l'inoculum est toujours constitué à partir d'une suspension de spores n'ayant pas plus de 10 jours. Celle-ci est préparée à partir des cirrhes pycnidiens qui sont dissouts dans de l'eau distillée stérile. Pour faciliter la dispersion des spores et obtenir une dilution homogène, une goutte de TWEEN 20 est ajoutée. Cette suspension mère, très concentrée en spores, est ensuite diluée afin d'obtenir une concentration finale d'inoculation de l'ordre de 10^6 spores/ml. Le comptage des spores est effectué à la cellule de Malassez.

L'âge de la culture du champignon et la concentration en spores de l'inoculum ont été déterminés à partir de nos travaux (BOUZNAD (1976, 1978) et de ceux de WALLEN (1957), BLACKEMAN (1967), COUSIN (1978), ALI et al., (1978).

2.7.3. L'INOCULATION

Qu'il s'agisse de plantules entières, de graines, d'épicotyles, d'organes végétaux détachés (folioles, entre-noeuds) et maintenus en survie, dans tous les cas, l'inoculum est appliqué soit sous forme d'un nuage obtenu avec un pulvérisateur à piston ou à pistolet, soit déposé ponctuellement sous forme de gouttelettes de spores à l'aide d'une micropipette (5 à 10 μ l). Cette dernière méthode a été surtout utilisée pour les études en microscopie électronique, car elle permet de localiser exactement l'endroit des inoculations. La méthode par pulvérisation a été essentiellement pratiquée sur plantules entières cultivées en terrines lors des tests destinés à apprécier le pouvoir pathogène des inoculations croisées ou à mettre en évidence les races physiologiques.

La contamination des graines est obtenue par trempage pendant 15 à 20 minutes dans la suspension de spores.

2.7.4. DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX ET CONDITIONS D'INCUBATION

Etant donné la diversité des procédés d'inoculation utilisés dans ce travail, pour chaque type d'inoculation, nous précisons ci-dessous la qualité du matériel végétal, le dispositif expérimental et les conditions de l'incubation.

- INOCULATION EN SERRE

Les plantules sont produites, soit dans des terrines remplies de sable ou de terreau à raison de 10 rangées de 10 graines, soit dans des pots contenant 10 graines chacun.

Le premier dispositif (Fig.11) a été utilisé pour l'étude des races physiologiques alors que le second (Fig.12) concerne la spécialisation parasitaire des *Ascochyta* ssp. sur légumineuses.

Après inoculation, les terrines sont recouvertes d'un couvercle transparent en plexi glace afin de maintenir une hygrométrie saturante et d'éviter toute dessiccation. De plus, des pulvérisations d'eau sont fréquemment effectuées. Après 72 h, les terrines reçoivent 4 à 5 nébulisations par jour à raison d'un quart d'heure chacune, et ceci pendant une douzaine de jours. En l'absence du système automatique de nébulisation, les pulvérisations d'eau journalières sont effectuées manuellement.

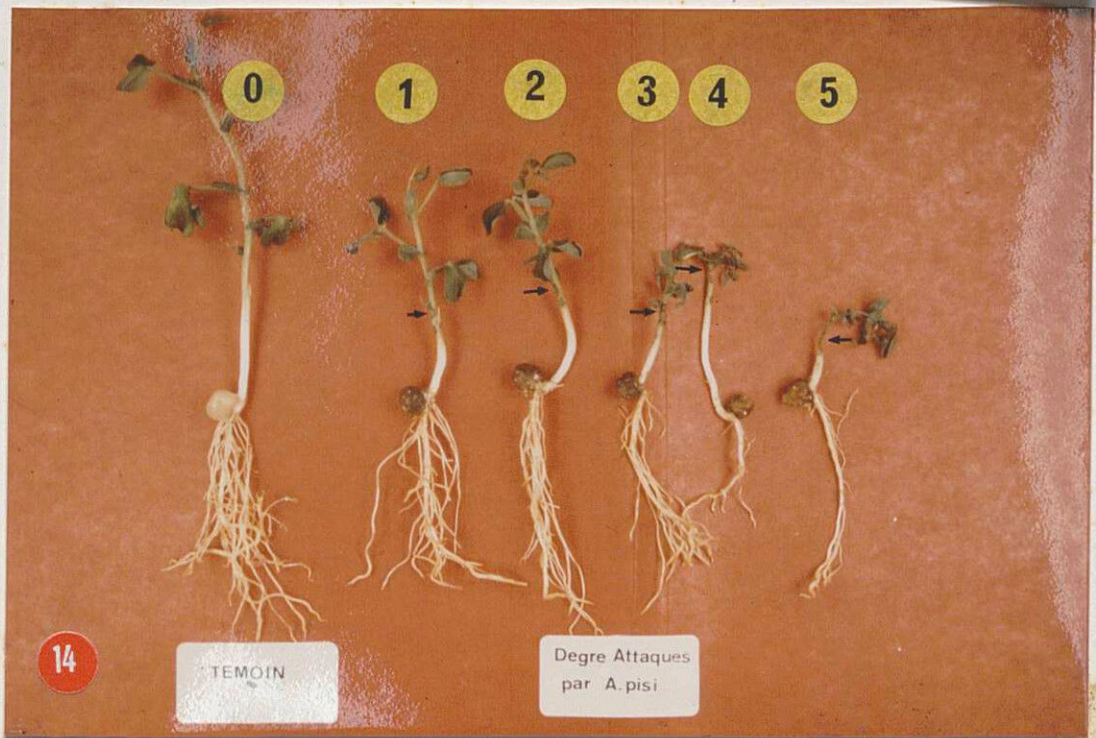
Fig. 11 : Présentation d'une cellule de serre chauffante montrant la disposition des plantules en pots après inoculation (station de Pathologie végétale, Versailles).

Fig.12: Vue d'une autre cellule de serre climatisée équipée d'un dispositif d'arrosage par nébulisation (→) et d'un climatiseur (→). Serre de l'I.N.P.V., EL Harrach (Alger).

Fig. 13 : Dispositif d'inoculation artificielle. Il est constitué par des boîtes en matière plastique munies d'un couvercle (→); les plantules de Pois reposent sur des supports constitués de tubes à hémolyse (→)

Fig. 14 : Echelle de notation utilisée. Les chiffres de 0 à 5 correspondent à une importance croissante des nécroses sur les tiges et les folioles (→)





- INOCULATION AU LABORATOIRE

Dans ce cas, le matériel végétal utilisé est généralement cultivé en serre pour obtenir des folioles, des stipules ou ^{des} entre-noeuds, ou en laboratoire pour la production d'épicotyles (cf. 2.1.2.). Dans ces conditions, l'inoculation consiste à déposer une goutte d'inoculum (5 μ l) sur le matériel végétal maintenu en survie (Fig.13). Ce dispositif a été retenu pour l'étude de l'établissement des relations hôte-parasite en microscopie électronique à balayage et à transmission. L'eau utilisée pour le maintien de la survie du matériel en condition hermétique permet d'éviter le dessèchement de l'inoculum durant les 72 heures nécessaires à la pénétration du pathogène.

- INOCULATION DES GRAINES

Comme pour les précédentes inoculations, l'étude de la transmission d'*A. pisi* de la graine à la plante a été réalisée au laboratoire puis en serre. La technique de contamination externe des graines retenue est celle décrite par RAYNAL (1972) pour le *Colletotrichum gossypii*.

Les graines immergées dans une suspension de spores (10^6 spores/ml) durant 15 minutes, sont ensuite séchées à l'air libre afin de permettre une meilleure adhérence des spores sur les graines. Puis elles sont semées dans des terrines avec comme substrat de la vermiculite ou du terreau préalablement stérilisé. L'humidité étant un facteur déterminant pour le développement de l'antracnose du Pois, toutes les terrines sont arrosées avec la même quantité d'eau.

Avec cette méthode d'inoculation, deux aspects de la transmission d'*Ascochyta pisi* par les graines ont pu être abordés:

- L'influence de la température et de la durée d'imbition des graines sur la transmission du pathogène;
- Et l'influence du pouvoir pathogène des isolats et de la sensibilité ou de la résistance de l'hôte sur le degré de transmission du champignon.

Afin d'étudier l'action du froid sur la conservation de l'inoculum au niveau de la graine, des graines naturellement contaminées, ont été immergées pendant des temps variables dans de l'azote liquide, puis incubées sur milieu de culture selon les règles internationales d'essais de semences (ISTA, 1976).

2.7.5. NOTATIONS UTILISEES POUR QUANTIFIER L'EXPRESSION DU POUVOIR PATHOGENE ET LA TRANSMISSION PAR LA GRAINE

Pour caractériser le pouvoir pathogène d'un champignon et estimer l'importance de l'attaque, les notations adoptées varient en fonction des types de symptômes.

En ce qui concerne les maladies à anthracoses sur les parties aériennes du végétal, différents auteurs ont proposé des systèmes d'évaluation de l'attaque basés sur différentes échelles de notations (WALLEN, 1957; BANNEROT, 1965; COUSIN, 1972; RAYNAL, 1972; VIR et GREWAL, 1974; SINGH et al. 1981).

Dans notre cas, nous avons retenu celle allant de 0 à 5 couramment utilisée dans l'étude de l'anthracnose du Pois causée par *A. pisi*. (Fig. 14).

Cette échelle, basée sur l'apparition et l'importance des nécroses au niveau des entre-nœuds, est définie comme suit:

- 0 : immunité totale;
- 1 : rares tâches petites et très localisées;
- 2 : assez nombreuses taches sur tiges bien localisées, la plante survit toujours;
- 3 : assez nombreuses taches nécrotiques avec des zones d'accroissement visibles et plus ou moins coalescentes; la plante survit rarement;
- 4 : nombreuses taches étendues sur l'ensemble de la tige avec important flétrissement des feuilles; la plante meurt fréquemment;
- 5 : infection généralisée, les plantes sont mortes à la notation.

A partir de ces notations, l'intensité de la maladie (= pouvoir pathogène) est évaluée en calculant l'indice d'attaque tel qu'il a été proposé pour d'autres maladies (DIMOND et al. 1952, RAYNAL, 1972 et EL SAMRA et al., (1981).

Cet indice s'obtient comme suit:

$$C_S = \frac{\sum \text{des degrés d'attaque}}{\text{Nbre total de plantules}}$$

C_S : Coefficient de sensibilité

Ceci permet d'apprécier quantitativement l'attaque et d'exprimer globalement le niveau de sensibilité ou de résistance de la plante.

Pour estimer l'importance de la transmission du champignon par la graine, l'intensité de l'attaque au niveau des plantules n'a pas été retenue. On lui a préféré le nombre de plants présentant des nécroses dues au pathogène inoculé ainsi que les graines n'ayant pas levé par rapport au témoin.

Enfin, pour certaines inoculations réalisées au laboratoire (épicotyles ou folioles maintenus en survie), seule la réussite ou l'échec de l'infection a été prise en considération. En ce qui concerne les inoculations ponctuelles destinées à l'étude du processus infectieux (ne dépassant pas 48 h.), en microscopie photonique ou en M.E.B., les notations ont porté sur la germination des spores ainsi que sur les modalités de la pénétration du champignon, avec ou sans formation d'appressorium.

2.8. ETUDE DES RELATIONS HOTE-PARASITE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (M.E.B.)

2.8.1. PRELEVEMENT DES TISSUS

Dans tous les cas et quelle que soit la technique de M.E.B. utilisée, les échantillons sont soit de petits carrés de folioles de 2 mm de côté, soit de petits cylindres de 2mm de longueur prélevés dans des entre-noeuds ou desépicotyles de jeunes plantules de Pois. Le prélèvement s'effectue toujours à l'endroit où la suspension de spores a été préalablement déposée.

Deux types de matériel végétal ont toujours été utilisés: le sensible avec les cultivars "Merveille de Kelvedon" et "Frisson" et le résistant avec les cultivars "Rondo" et "Finale". Il est à noter que dans de nombreux

cas, nous avons procédé à des inoculations d'entre-noeuds à différents stades de développement des plantules.

Deux méthodes de préparation du matériel ont été utilisées: technique du point critique et cryo-scanning.

2.8.2. PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL PAR LE POINT CRITIQUE

C'est la technique de M.E.B. couramment utilisée et décrite par d'autres auteurs (HAYAT, 1974; GUILLAUMIN, 1980; READ et al., 1983).

Après une fixation classique (cf. § 2.9.1.) le matériel est déshydraté par une série d'alcool éthylique de degré croissant, jusqu'à l'alcool absolu. Les pièces sont ensuite plongées dans une solution d'acétate d'iso-amyle et séchées dans l'appareil à point critique, en utilisant du CO₂ comme liquide de substitution.

Le principe de la technique repose sur les lois physiques d'équilibre de certains gaz et liquides. La réalisation du point critique consiste à remplacer l'eau cellulaire des échantillons biologiques par un gaz (CO₂) à l'aide de différents bains de substitution (Alcool, Amylacétate, Acétone). L'étape Acétone - CO₂ se fait dans une enceinte où le contrôle de la température (31°C) et de la pression (72,9 atm.) sont déterminantes pour avoir le minimum possible de modifications morphologiques des échantillons.

Après cette opération, les échantillons subissent une métallisation puis ils sont observés à l'aide d'un M.E.B. type 07 CAMECA.

2.8.3. PREPARATION DU MATERIEL POUR UNE OBSERVATION EN "CRYO-SCANNING"

Le matériel destiné à être observé en "cryo-scanning" ne subit aucune fixation chimique au préalable. Les conditions d'observations sont celles définies par TESSIER et BERIER (1979).

Les échantillons prélevés, collés sur les supports porte-objets à l'aide d'une pâte d'argile (KAOLINITE), sont ensuite fixés sur le bras porte-objet du microscope et plongés dans un liquide réfrigérant (Fréon liquide). Après 10 à 15 s. de refroidissement, l'ensemble est introduit dans le microscope où une mince couche d'or (20 μm d'épaisseur) est vaporisée sur les échantillons (= métallisation). L'objet est ensuite amené dans la colonne du microscope où il est déposé sur le plateau d'orientation (goniomètre). La température de l'enceinte est maintenue à - 80°C.

L'appareil utilisé est un JEOL JSM 35 équipé en CRYO-SCAN, auquel est incorporé un appareil photographique de 120 mm pour la prise de vue.

2.9. METHODES ET TECHNIQUES D'ETUDE DES RELATIONS HOTE-PARASITE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (M. E. T.)

Une recherche bibliographique sur les méthodes de préparation du matériel biologique pour une étude en M.E.T. a montré que les méthodes de fixation généralement pratiquées sont aussi variées que les échantillons à étudier, et qu'elles sont fonction des objectifs visés. Elles varient souvent d'un chercheur à un autre et dépendent généralement des routines des laboratoires, voire même des chercheurs.

Partant de ces considérations et des exigences techniques de chaque étape, afin de garantir le résultat final, des essais préliminaires sur tissus sains ont été réalisés afin de déterminer: l'osmolarité finale du fixateur, le choix du tampon (phosphate ou cacodylate) et certains paramètres telles que la durée et la température de chaque étape. A l'issue de ces essais, les protocoles suivants ont été retenus.

2.9.1. TECHNIQUE D'ETUDE CYTOLOGIQUE

Pour l'étude cytologique, la technique de la double fixation glutaraldéhyde-postosmié, préconisée par SABATINI et al. (1963), a été adaptée à notre matériel biologique (*Pisum sativum*, tissus infectés ou non).

- PREFIXATION

Les échantillons prélevés sont préfixés pendant 3 h. à la température de la glace fondante dans une solution de glutaraldéhyde 6% dans du tampon cacodylate 0,1M, pH 7,2, additionné de saccharose 0,4 M.

L'osmolarité finale de cette solution voisine de 420 m. osm. correspond à celle conseillée par HICKEY et COFFEY (1977) et à celle de l'extrait de Pois mesurée par osmomètre. Elle provoque une légère hypertonie qui s'est avérée tout à fait satisfaisante pour les tissus de Pois étudiés.

Afin de permettre une bonne pénétration du fixateur, le premier quart d'heure de la préfixation est réalisé sous-vide. Le reste de la fixation est fait à la pression atmosphérique après changement du fixateur.

Après la préfixation, les échantillons sont rincés quatre fois dans le même vecteur (tampon cacodylate, pH = 7,2 + saccharose 0,4 M) pendant 15 mn.

- POST-FIXATION

Après rinçage, les pièces sont post-fixées durant 2 h. dans une solution de tétroxyde d'osmium à 2 % dans le même tampon cacodylate 0,1 M pH 7,2 additionné de saccharose 0,4 M.

Les échantillons sont ensuite soigneusement rincés dans 4 bains de 15 mn chacun dans une solution de saccharose à 0,4 M.

- CONTRASTE SUR BLOC

Etape non obligatoire, mais utilisée par certains auteurs (HAYAT, 1970). Elle consiste à faire un premier contraste des pièces sur bloc, par une solution aqueuse d'acétate d'uranyle à la concentration de 2 % dans de l'eau. Elle a lieu à l'obscurité totale et à la température ambiante du laboratoire pendant 45 mn.

Cette dernière étape est suivie d'un rinçage soigneux à l'eau distillée filtrée à raison de 4 bains de 15 mn. chacun.

- DESHYDRATATION - SUBSTITUTION - IMPREGNATION - INCLUSION

Après fixation, les échantillons sont déshydratés par des bains de 30 mn chacun dans une série croissante d'éthanol: 50°, 70°, 95° et 100°.

La substitution est ensuite réalisée par des mélanges progressifs d'éthanol et d'oxyde de propylène dans les proportions 3/4, 1/2, 1/4 et 3 bains d'oxyde de propylène pur. Ces bains durent 15 mn chacun.

Enfin, avant l'inclusion dans de la résine pure (KIT DURCUPAN), selon la technique proposée par GLAUERT (1958), les échantillons subissent une imprégnation progressive par la résine selon un schéma semblable à celui décrit pour la substitution: 3/4 d'oxyde de propylène + 1/4 de résine, 1/2 d'oxyde de propylène + 1/2 de résine, 1/4 d'oxyde de propylène + 3/4 de résine et enfin 3 bains sous vide dans de la résine pure.

La durée des bains de mélange varient entre 12 et 24h., tandis que ceux dans la résine pure ne durent qu'une heure.

L'inclusion proprement dite des échantillons dans des gélules ou en bloc plat, se fait en deux étapes: d'abord durant 12h à 45°C puis 72 h à 60°C.

- REALISATION DES COUPES SEMI-FINES ET ULTRA-FINES

La taille préalable des blocs est faite au pyramitome LKB ou à main levée. La recherche des zones intéressantes pour l'observation en M.E.T. est faite sur coupes semi-fines de 1 μm d'épaisseur obtenues à l'ultra-microtome LKB (III ou IV) colorées par une solution de bleu de toluidine (TRUMPF et al. 1961) ou de paragon (in AMEZIANE, 1981).

Les coupes ultra-fines sont obtenues avec les mêmes ultra-microtomes, en utilisant couramment des couteaux en verre sur lesquels des cuvettes ont été confectionnées. Pour des blocs plus difficiles, un couteau en diamant a été utilisé.

Les coupes sélectionnées d'après leur couleur (jaune et blancgris), sont récupérées sur des grilles en cuivre ou en or de 100 à 200 mèches, et recouvertes au préalable d'un film de formvar ou de collodion.

- CONTRASTES

D'une façon générale les coupes sont d'abord contrastées à l'acétate d'uranyle 0,5% (15mn); puis après séchage, par une solution de citrate de plomb durant 7 à 9mn (REYNOLDS, 1963). Ces opérations sont effectuées par flottaison des grilles à l'abri de la lumière pour l'acétate d'uranyle et à l'abri du CO₂ atmosphérique (en présence de Na OH) pour le citrate de plomb.

Les grilles ainsi préparées ont été observées dans deux laboratoires: à l'I.N.A. d'El-Harrach (Alger) avec un HITACHI HU 12 A et au laboratoire de Cytologie Expérimentale et Morphogenèse végétales (PARIS VI) avec un microscope Philips EM 301 S.

2.9.2. ETUDES CYTOCHIMIQUES ET CYTOENZYMOLOGIQUES

Au cours de nos observations ultrastructurales, certains aspects structuraux ont été mis en évidence. Afin de préciser quelques aspects biochimiques de ces structures apparues au cours du processus infectieux provoqué par *A. pisii* chez le Pois, des recherches cytochimiques et cytoenzymologiques ont été réalisées.

A cet effet, quelques techniques spécifiques largement utilisées ont été mises en oeuvre. Nous rappellerons donc le principe général des différentes techniques employées et la procédure de préparation des échantillons.

- DETECTION CYTOCHIMIQUE DES POLYSACCHARIDES (TEST P.A.T.Ag)

La recherche des polysaccharides sur coupes ultrafines en microscopie électronique à transmission peut être réalisée par un test cytochimique (P.A.T.Ag) mis au point par THIERY (1967) et appliqué aux tissus végétaux par ROLAND (1970).

Il dérive de la réaction histochimique classique connue sous le nom de P.A.S. (Periodic Acid Schiff).

Le principe du P.A.T.Ag repose sur la possibilité d'oxydation sélective par l'acide periodique des fonctions vic-glycol présentes sur les chaînes polysaccharidiques. Cette oxydation libère des fonctions aldéhydes qui peuvent être visualisées par l'intermédiaire de la thiocarbohydrazide et du protéinate d'argent.

Dans les études ultrastructurales des relations hôte-pathogène, la caractérisation des structures de nature polysaccharidique par le test P.A.T.Ag a été souvent utilisée (ROLAND, 1974; DELON, 1975; SALLE, 1975; HICKEY et COFFEY, 1978; MOURICHON et SALLE, 1981; DURAND et SALLE, 1981).

Ces tests sont donc réalisés sur du matériel préparé de la même façon que celui utilisé pour les études cytologiques (§ 2.9.1.) avec une seule différence: les coupes ultrafines sont récupérées sur des grilles en or, métal non attaqué par les réactifs.

Les préparations (coupes) subissent les traitements suivants:

1. Oxydation pendant 30 mn par l'acide periodique à 1 % dans de l'eau distillée;
 2. Lavages soigneux à l'eau distillée: 2 lavages rapides et 3 lavages de 10 mn chacun;
 3. Traitement par une solution de thiocarbohydrazide à 0,2% dans de l'acide acétique à 20 % pendant 48h.
 4. Rinçages dans des bains d'acide acétique de concentration décroissante (20%, 5%) puis dans de l'eau distillée;
-

5. Traitement par une solution de protéinate d'argent à 1% dans l'eau distillée. La réaction dure 12 h. à l'obscurité et à la température ambiante du laboratoire;
6. Rinçage des préparations à l'eau distillée, puis séchage.

L'observation des coupes au microscope électronique est réalisée sans aucun contrastes supplémentaire.

Il est important de noter que ce genre de recherche cytochimique nécessite des témoins qui sont constitués par du matériel n'ayant pas subi de traitement par la solution de thiocarbohydrazide ou l'oxydation ménagée.

- DETECTION CYTOENZYMATIQUE DES PEROXYDASES

Depuis la mise au point par GRAHAM et KARNOWSKY (1966) d'une méthode de détection et de localisation des peroxydases en microscopie électronique, de nombreux travaux ont été réalisés sur tissus végétaux (POUX, 1969, 1970, 1974; CZANINSKI et CATESSON, 1970 et 1972, NOUGAREDE et al., 1967; BROSSARD, 1973).

Cette réaction cytoenzymologique repose sur la spécificité de la diamino-benzidine (D.A.B.) qui, utilisée comme substrat avec H_2O_2 , se transforme en présence de l'enzyme en un polymère stable, dense aux électrons.

Comme pour la plupart des recherches cytoenzymologiques, la démarche générale reste identique: le matériel végétal subit une pré-fixation par le glutaraldéhyde, une incubation dans le substrat de l'enzyme et une post-fixation osmique. Par la suite, les échantillons sont soumis aux traitements classiques de la fixation:

déshydratation, substitution, imprégnation et enfin inclusion dans de la résine pure.

Mais dans le détail, la bibliographie nous a permis de constater que les conditions de déroulement du test (osmolarité, pH, tampon, durées des lavages), peuvent varier selon les auteurs, en fonction du matériel biologique et des objectifs poursuivis. Dans notre cas, et en l'absence de données précises spécifiques à notre matériel, nous avons suivi la méthode générale, tout en adaptant notre matériel aux conditions précédemment définies (cf. 2.9.1.). En ce qui concerne les paramètres du milieu d'incubation, nous nous sommes inspirés des résultats obtenus par certains auteurs lors de travaux réalisés sur les relations hôte-parasite (DELON, 1974; BOISSIERE, 1978; COULOMB et COULOMB, 1984; COULOMB et al., 1985).

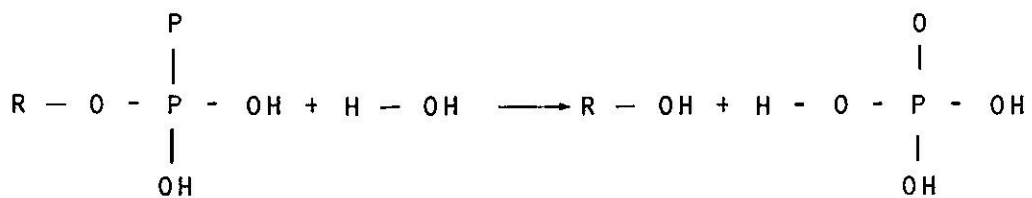
Les échantillons passent par une préfixation classique dans le mélange glutaraldéhyde-vecteur (cf.2.9.1) toujours à froid afin d'éviter une diffusion de l'enzyme (PEREZ RODRIGUEZ et CATESSON, 1982). Les échantillons sont ensuite lavés dans une solution de saccharose à 10 % durant la nuit (GRAHAM et KARNOWSKY, 1966; POUX, 1969; DELON, 1974; BOISSIERE, 1978, PEREZ RODRIGUEZ et CATESSON, 1982). Après rinçage, les échantillons sont incubés dans le milieu retenu par MENGHDEN (1975) et COULOMB et COULOMB (1984):

- . Diamino-Benzidine (D.A.B.)..... 10 mg
- . H₂O₂ à 1 % (fraichement diluée)..... 0,2 ml
- . Tampon acétate 0,05 M pH 5,0..... 10 ml
- . Saccharose 5% 0,7 g

L'incubation est réalisée durant 1 h sous vide partiel à l'obscurité et à une température de 37°C. Les témoins sont constitués par des lots n'ayant pas H₂O₂ dans leur milieu d'incubation. Après rinçage des échantillons par 4 bains de tampon de 15 mn chacun, les échantillons subissent les mêmes traitements que ceux décrits pour la recherche des polysaccharides, jusqu'à l'inclusion dans la résine.

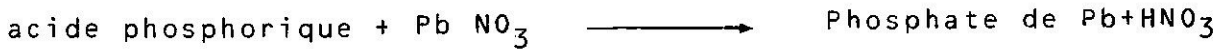
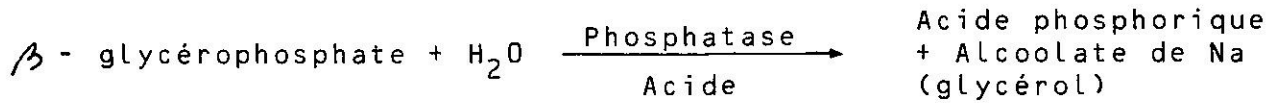
- DETECTION CYTOENZYMATIQUE DE LA PHOSPHATASE ACIDE

La mise en évidence de l'activité phosphatase acide par la technique classique de GOMORI, est définie par les propriétés chimiques de la réaction de l'enzyme. En milieu acide, l'hydrolyse des esters phosphatés entraîne la libération d'ions phosphate selon la réaction chimique décrite par POUX (1974).



où R est un radical organique

Cet ion phosphate en présence de plomb apporté dans le milieu de GOMORI sous forme de nitrate (Pb NO₃), donne un composé stable dense aux électrons qui permet de révéler, en microscopie électronique, la présence in situ de l'enzyme. La réaction peut être schématisée de la façon suivante:



Dans la pratique, les spécimens préalablement fixés par le mélange glutaraldéhyde - vecteur (cf. peroxydase), sont lavés durant 24 h par plusieurs bains dans le même tampon que celui utilisé pour la fixation. Après ce lavage soigneux, les pièces sont incubées dans le milieu de GOMORI préparé extemporanément dont la composition est la suivante:

- . β - glycérophosphate de Na..... 10 mg
- . Nitrate de plomb..... 12 mg
- . Tampon phosphate 0,05 M pH 5,0..... 10 ml

Pour favoriser la pénétration du substrat, l'incubation dans le milieu de GOMORI a été réalisée en deux temps (POUX, 1970): d'abord à froid durant une nuit, dans le réfrigérateur (3 - 4°C); puis à chaud (37°C) pendant 45 mn.

Toujours pour la même raison (pénétration), les échantillons sont redécoupés en pièces plus petites avant d'être incubés.

Après des lavages dans de l'eau saccharosée, le traitement des pièces est poursuivi selon les techniques habituelles, jusqu'à l'inclusion dans la résine.

Ici, les témoins sont constitués par des pièces incubées dans le milieu de GOMORI dépourvu de substrat (-glycérophosphate de Na); le reste des traitements demeure inchangé .

- DETECTION CYTOENZYMATIQUE DE LA POLYPHENOL-OXYDASE

Parmi les enzymes oxydatives, les polyphénol-oxydases (= phénolase, tyrosinase, dopa-oxydase), qui catalysent l'oxydation aérobie de certains phénols, ont été largement rapportées (FRIES, 1976; MARTYN et al., 1979; GOODMAN et al., 1986). Leur intervention dans la formation de la nécrose a été fréquemment démontrée. L'accumulation de composés phénoliques dans les tissus de Pois attaqués par l'antracnose signalée par HEATH et WOOD (1971), nous a incité à rechercher *in situ* ce type de substances.

En cytochimie ultrastructurale, la localisation de l'activité phénolasique est basée sur la visualisation du produit final de la réaction, entre le substrat constitué par le 3,4 Dihydroxyphénylalanine (DOPA) et son enzyme, en présence d'oxygène. Le produit final de nature mélanique insoluble (BROSSARD, 1973) est très dense aux électrons.

Nous avons donc utilisé la technique décrite par NOVIKOFF et al. (1968) qui a été adaptée à l'origine aux végétaux par CZANINSKI et CATESSON (1972), puis reprise par d'autres auteurs (BROSSARD, 1973; MULLER et BECKMAN, 1978; MARTYN et al. (1979).

Comme pour les précédentes recherches cytoenzymatiques, les échantillons subissent une préfixation par le mélange glutaraldéhyde-vecteur.

Les échantillons sont ensuite lavés durant une nuit dans un tampon cacodylate 0,2 M à pH 7,2 avec du saccharose 5%. Puis ils sont incubés dans le mélange suivant:

- . Dihydroxyphénylalanine (D.O.P.A.) 50 mg
- . Tampon phosphate pH 7 0,05 M 10 ml
- . Glucose 5 %

Comme pour la phosphatase acide, les tissus sont d'abord mis à incuber au réfrigérateur (3 - 4°C) pendant une nuit, puis à 37°C durant 1 h. De même, le lot de pièces constituant le témoin, est incubé dans le même milieu dépourvu de substrat (D.O.P.A.).

Le reste de la procédure menant à l'inclusion des pièces est identique à celle décrite pour les précédents tests cytochimiques.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. PRINCIPALES ESPECES D'Ascochyta spp. IDENTIFIEES SUR LEGUMINEUSES EN ALGERIE

Avant d'aborder le sujet proprement dit de notre étude sur l'antracnose du Pois causée par *A. pisi*, nous avons estimé nécessaire de faire le point sur le problème des antracnoses sur Légumineuses en Algérie. Cette synthèse prend en compte nos observations personnelles (BOUZNAD, 1976, 1978 et 1983) ainsi que celles concernant certains aspects particuliers de la maladie rapportés dans des mémoires d'ingénieurs que nous avons dirigés (LOUNIS, 1982; MOHAMMEDI, 1983; DJAOUI, 1986; ZAATRI, 1987).

3.1.1. RECENSEMENT DES ESPECES FONGIQUES ISOLEES

Pois= *Pisum sativum*

Les trois principales espèces causant l'antracnose du Pois (JONES, 1927) ont été couramment isolées en Algérie depuis 1975, à partir de plusieurs cultivars

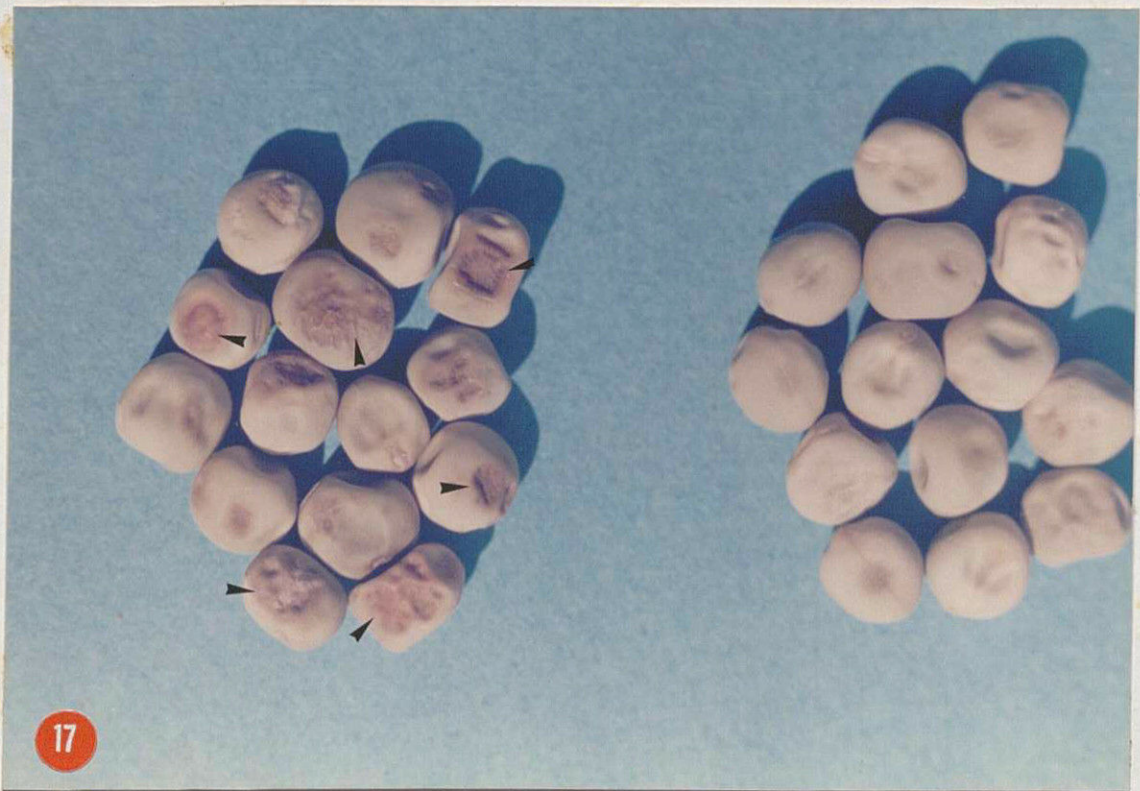
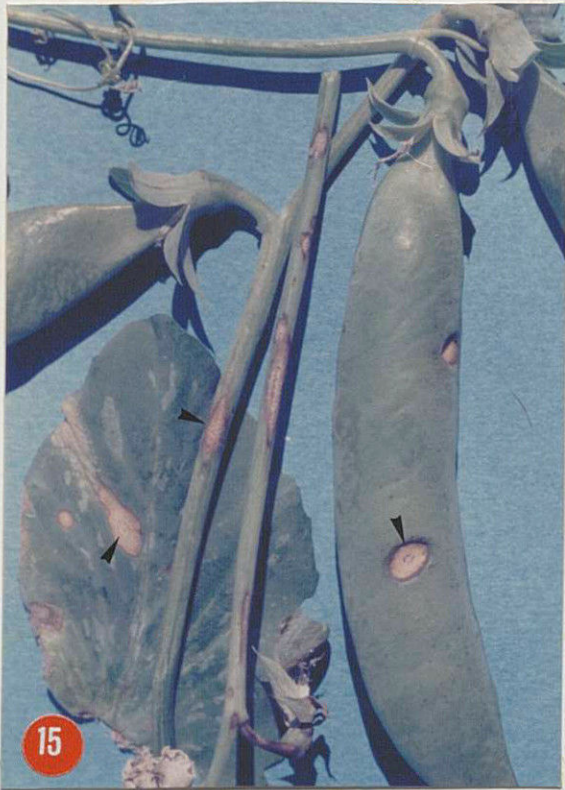
- *A. pisi* Lib.: Caractéristique par les symptômes qu'elle provoque notamment au niveau des gousses (Fig.15), cette espèce est de loin la plus fréquente dans nos cultures et c'est elle qui cause le plus de dégâts. L'analyse de plusieurs lots de semences produits en Algérie (BOUZNAD, 1976) a montré jusqu'à 50% de contamination.

- *A. pinodes* JONES: Bien que moins répandue, cette espèce peut provoquer des dégâts plus importants quand le temps est humide. Elle se distingue de la première, par des taches

Fig. 15 : Symptômes typiques de l'attaque des différents organes du Pois (folioles, tiges et gousses) par *Ascochyta pisi*. Les nécroses présentent un halo central clair et un pourtour très foncé (➤), les pycnides sont visibles au centre des nécroses.

Fig. 16 : Symptômes des attaques par *Ascochyta pinodes* sur folioles de Pois. Dans ce cas, les nécroses sont foncées (➤) et ne montrent pas de pycnides.

Fig. 17 : Nécroses d'antracnose (➤) sur graines de Pois, consécutives à des attaques par les trois espèces d'*Ascochyta* (*A. pisi*, *A. pinodes* et *A. pinodella*). A droite de la figure, aspect d'un lot de graines saines.



Figs. 18 a et b : Symptômes d'attaque des différents organes de Pois chiche par l'antracnose due à *Ascochyta rabiei*. 18 a, attaques sur tige de jeunes plantules (➤); 18 b, attaques tardives sur tiges et sur gousses, avec des pycnides disposées concentriquement.

Fig. 19 : Gousse de haricot (★) avec une nécrose circulaire importante (➡) à partir de laquelle a été isolé l'*Ascochyta phaseolorum* = *Phoma exigua*. Les petites flèches indiquent des pycnides sous-épidermiques

Fig. 20 : Graine de haricot (★) du cultivar "Contender" à partir de laquelle a été isolée par la méthode d'Agar-test, l'espèce *Ascochyta pinodes*. La flèche blanche montre des pycnides avec cirrhes disposées en ligne sur le milieu de culture; cette disposition est typique de l'espèce.

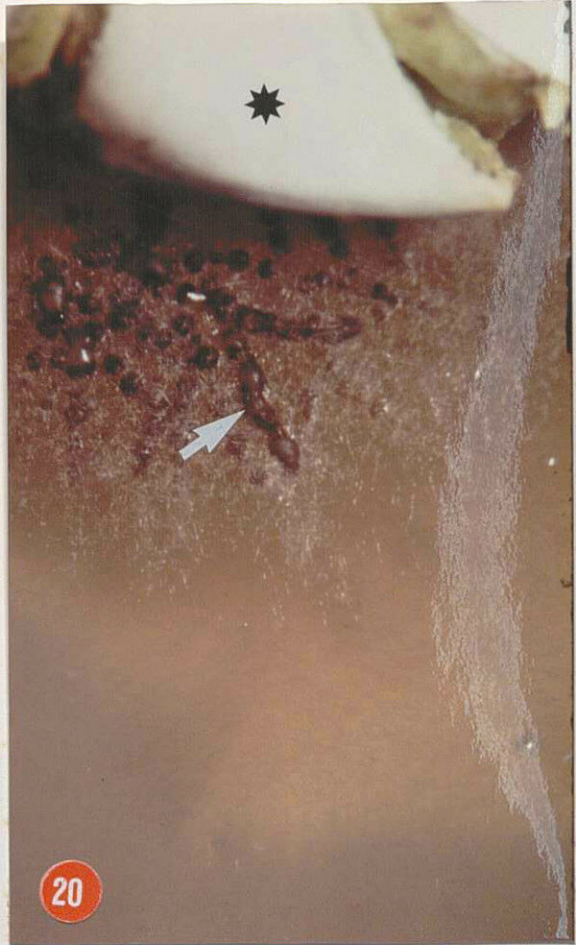
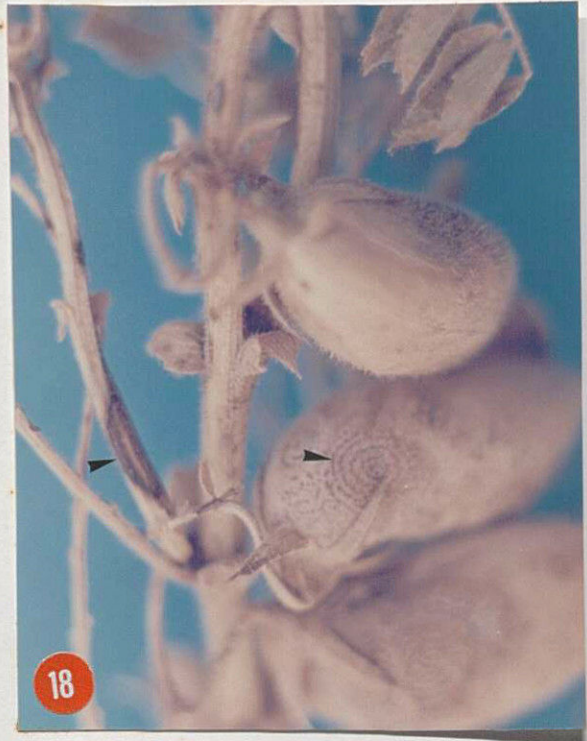


Fig. 21 : Taches nécrotiques d'antracnose sur folioles de fève (➤) à partir desquelles deux espèces d'*Ascochyta* ont été isolées : *A. pinodella* et *A. fabae*.

Fig. 22 : Gousses de fèves montrant des nécroses d'antracnose (flèches blanches) à partir desquelles une seule espèce a été isolée : *A. fabae*.

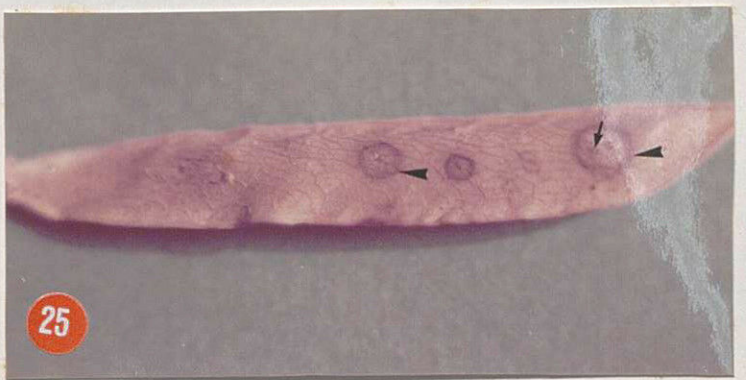
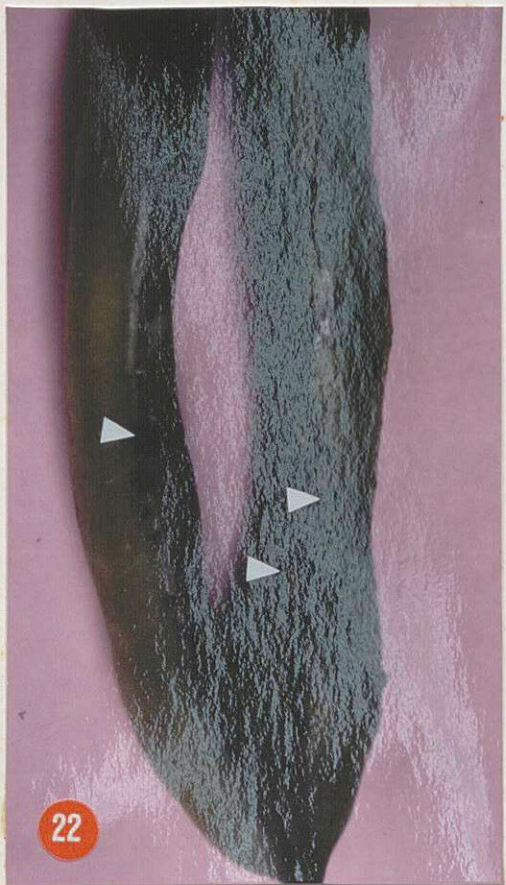
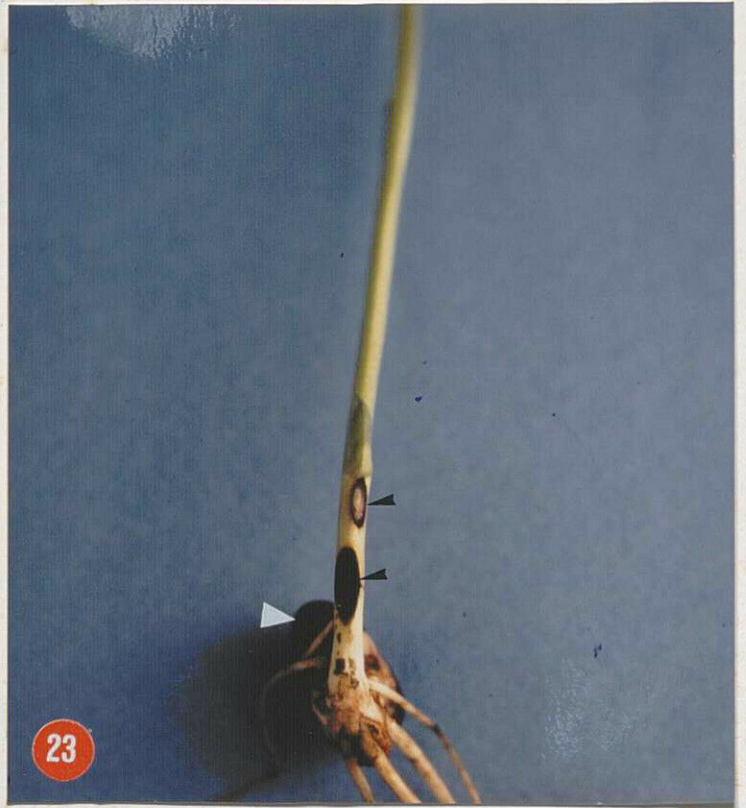
Fig. 23 : Symptômes d'attaques (➤) par *A. fabae* obtenus après inoculation artificielle des graines de fèves ()

Fig. 24 : Aspect général des symptômes d'antracnose sur les différents organes d'une gesse spontanée (➤).

Fig. 25 : Détail des taches nécrotiques circulaires sur une gousse de Gesse. Les nécroses sont caractérisées par un halo central clair et un pourtour très foncé (➤). La petite flèche, indique les pycnides au centre du halo.

Figs. 26 et 27 : Symptômes d'antracnose causés par *Ascochyta lentis* sur culture de lentilles. Les attaques sont caractérisées par un blanchissement prononcé de la zone nécrotique sur folioles (➤) et sur tige (➤).

Figs. 28 et 29 : Symptômes typiques d'antracnose sur folioles et tiges de vesces causés par *Ascochyta viciae*. Les nécroses sont très comparables à celles de l'*A. pisi* : halo central clair avec pycnides (➤) et pourtour très foncé (➤).





plus foncées; dans nos conditions climatiques habituelles, la formation de pycnides est beaucoup moins visible (Fig.16).

- *A. pinodella* JONES = Cette espèce est beaucoup moins fréquente que les deux précédentes au niveau du feuillage et des gousses; elle attaque surtout le collet des plantules.

Ces trois espèces ont été également isolées à partir d'un lot de semences de Pois fourrager du cultivar "Sefrou", fortement attaqué (Fig. 17). Ce cultivar est l'un des plus cultivé dans le pays.

Très fréquemment, les analyses réalisées sur des lots de semences produits en Algérie ou importés (Angleterre, France, Hollande), ont montré de forts taux de contamination par l'une de ces trois espèces, (BOUZNAD, 1976; SAHNOUN, 1977; BOUZNAD et al., 1982; LOUNIS, 1982). Ce problème des semences non contrôlées est à l'origine de la généralisation de cette maladie au niveau de toutes les régions de culture du Pois en Algérie.

Pois chiche = *Cicer arietinum* L.

Si pour la précédente culture l'identification des agents responsables de l'antracnose ne pose pas de difficulté majeure, au niveau du Pois chiche, le problème est différent, surtout lorsque les attaques sont localisées au niveau des tiges et du collet. En effet, d'autres espèces à pycnides qui ne sont pas habituellement responsables de cette maladie ont été isolées et identifiées à partir de ces organes (DJAOUI, 1986).

- Ascochyta rabiei (Pass.) Labr.:

Agent commun de l'antracnose du Pois chiche, c'est l'espèce la plus fréquente et celle qui cause le plus de dégâts sur la culture. Les symptômes avec des fructifications disposées concentriquement, sont très caractéristiques de cette espèce sur tiges, feuilles et gousses (Fig. 18).

L'antracnose du Pois chiche qui a déjà fait l'objet d'un programme de sélection variétale par LAUMONT et CHEVASSUS (1956), avait disparu, ou était en situation endémique, pendant plus d'une vingtaine d'années. Mais depuis ces dernières années, les cultures ont recommencé à être sérieusement menacées par cette maladie. Actuellement, de nouveaux travaux de recherche sur l'amélioration génétique sont entrepris avec la collaboration de l'Institut Technique des Grandes Cultures (I.T.G.C.).

- Ascochyta pinodella JONES =

Cette espèce isolée et identifiée à partir de plusieurs échantillons provenant de différentes régions d'Algérie, reste peu signalée par les auteurs sur cette culture. Elle a surtout été isolée à partir des tiges principales et de la région souterraine du collet.

Haricot = *Phaseolus vulgaris* L.

Normalement, cette culture est fréquemment attaquée par le *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Bri. et Cav., véritable agent de l'antracnose. Mais en Algérie cette espèce signalée par le passé, a disparu de nos cultures. En effet, les nombreux échantillons de l'herbier phytopathologique de l'I.N.A. (Alger) avaient été récoltés en 1956.

Des prospections effectuées par EMANOULLIDIS de 1970 à 1976 et par nous-même de 1975 à 1987, n'ont pas mis en évidence cet agent pathogène, tant dans les cultures que dans les analyses de semences. Par contre, nous avons isolé d'autres champignons à pycnides, non signalés par EMMANOULLIDIS (1976).

- *Ascochyta pinodes* JONES

Cette espèce a été détectée en 1982 lors d'une analyse sanitaire d'un lot de semences de Haricots du cultivar "Contender" provenant d'Annaba (Fig. 20). Non signalée sur Haricot dans la bibliographie, l'apparition de la forme parfaite type *Mycosphaerella pinodes*, a facilité son identification par ALLARD (Communication personnelle).

- *Ascochyta phaseolorum* SACC. = *Phoma exigua* BOEREMA

Cette espèce a été isolée d'une gousse de Haricot dont la nécrose présentait des pycnides (Fig. 19). L'échantillon avait été prélevé sur le marché d'El-Harrach, en 1981.

- *Ascochyta pinodella* JONES=

Elle a été isolée à partir du même lot de semences que celui ayant servi à l'isolement de *A. pinodes*. Son identification peut être contestée dans la mesure où elle ne possède pas de forme parfaite. Néanmoins, nous avons identifié tous les autres caractères qui la rapprochent de *A. pinodella*.

Fève = *Vicia faba* L.

- *Ascochyta fabae* SPERG.

Beaucoup moins connue en Algérie par les producteurs, l'importance économique de cette espèce et sa

transmission par les semences ont été établies par EMMANOULLIDIS (1976). Nous l'avons isolée pour la première fois en 1981 à partir d'un échantillon de gousses (Fig. 22) prélevé sur un marché local d'Alger (EL-ANASSER). Par la suite, elle a été observée dans les cultures en plein champ, dans certaines régions de l'Oranie (Sidi-Bel Abbès), du centre (EL Khemis, I.N.A. EL-Harrach) et de l'Est (Collo).

- *Ascochyta pinodella* JONES

Cette espèce a été isolée plusieurs fois, notamment à partir de lots de semences provenant de l'I.D.G.C. en 1983. Cette même espèce a été obtenue à partir de plants de fèves présentant des nécroses au niveau du collet et des feuilles (Figs 21 et 23). La transmission par les semences n'est pas signalée par les auteurs et n'est pas répertoriée dans les index de l'Association Internationale d'Essais de Semences (I.S.T.A.) (RICHARDSON, 1979, 1981 et 1983).

Enfin, nous signalons que d'autres espèces se rapprochant d'*Ascochyta pinodella* JONES, mais différentes par l'aspect cultural, ont été isolées à partir de cette culture; elles n'ont pas pu être déterminées.

Gesse = *Lathyrus ochrus*, *L. tinguianus* et *L. articulatus*

- *Ascochyta lathyræ* TRAIL

Cette espèce a été aussi isolée pour la première fois dans le pays en 1981, à partir de nécroses sur tiges présentant des pycnides; l'échantillon provenait du littoral Est d'Alger (Figuier). D'autres attaques ont été observées à l'I.N.A. (EL-Harrach) sur *Lathyrus tinguianus* et dans la région de Collo sur *L. tinguianus* et *L. articulatus* (Fig. 24).

Lentille = *Lens culinaris* MEDIK

- *Ascochyta lentis* BOND. et VASS.

Il s'agit de l'unique espèce sur lentille que nous ayons pu isoler et identifier en Algérie (Figs 26, 27).

Cette première détection en Algérie a été réalisée en Avril 1986 au cours d'une prospection effectuée dans la station expérimentale de l'I.T.G.C. à Sidi Bel Abbès.

Des attaques assez importantes ont été observées dans plusieurs parcelles destinées à des essais de comportement variétal. Par ailleurs, l'isolement de cette même espèce à partir d'un lot de semences provenant de ces parcelles attaquées, confirme la transmission de ce pathogène par les semences, mise en évidence par KAISER et HANNAN (1982). Plus récemment encore, ces mêmes dégâts ont été observés dans d'autres essais à Tiaret.

Vesce = *Vicia sativa* L.

- *Ascochyta viciae* Lib.

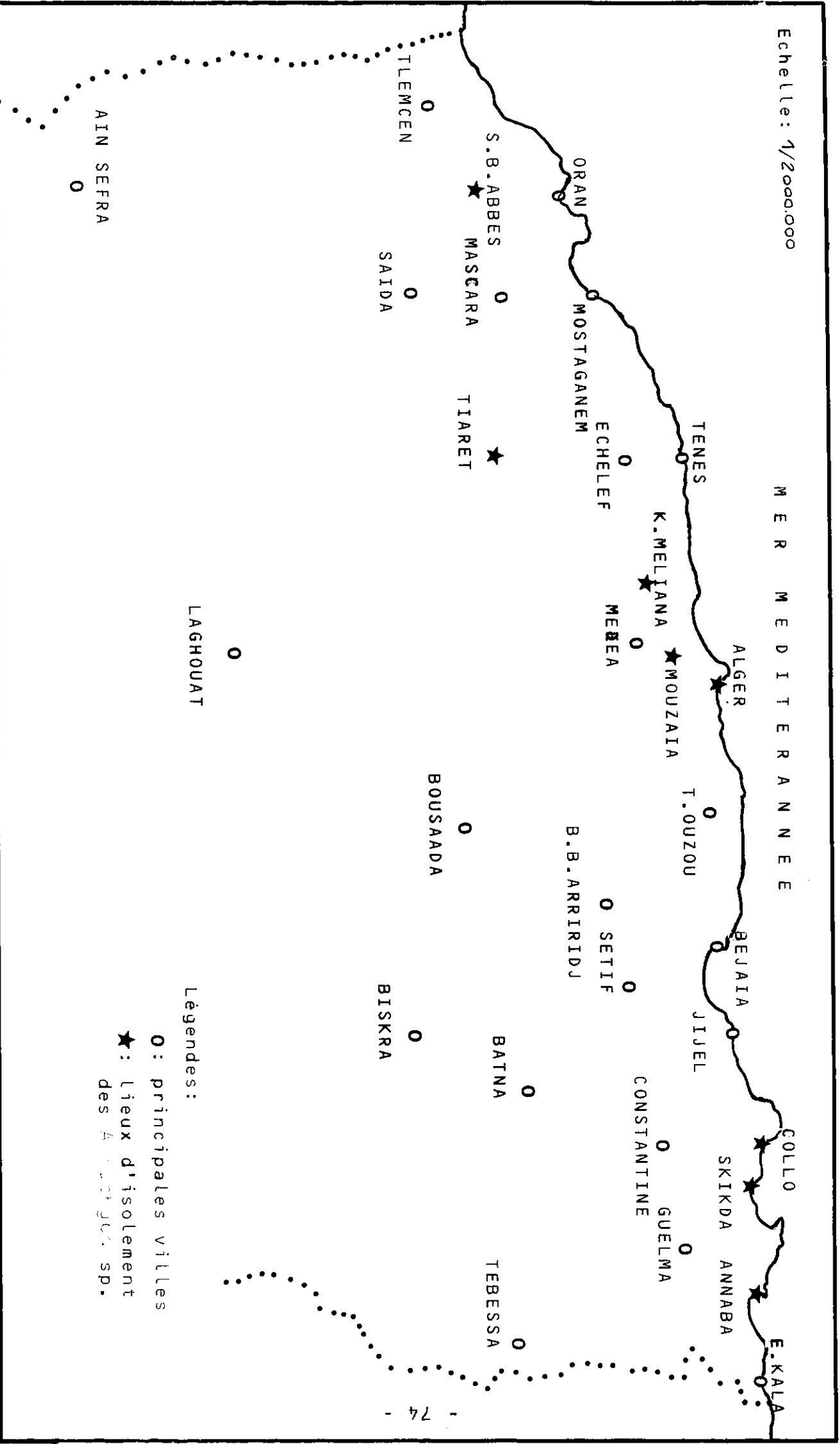
Signalée déjà en 1925 en Algérie (Herbier Phytopathologique de l'I.N.A. El-Harrach), nous avons isolé pour la première fois cette espèce en Algérie en 1981 à partir d'une culture spontanée de Vesce, poussant dans le Nord constantinois (Collo). Par la suite, des attaques sévères par cette même espèce, ont été observées dans des cultures de Vesces fourragères dans plusieurs autres régions du pays: domaine autogéré sur le littoral Ouest d'Alger (BOU ISMAIL en 1984), ferme pilote de l'I.N.A. (la même année), station expérimentale I.T.G.C. de Sidi-Bel-Abbès (1986) et récemment en Avril 1988 dans la région de Tiaret.

Les symptômes montrés par les Figures 28 et 29 sont très analogues à ceux de l'A. pisi.

Tabl. 6 ETAT RECAPITULATIF DES PRINCIPALES ESPECES D'Ascochyta ssp, ISOLEES POUR LA PREMIERE FOIS EN ALGERIE A PARTIR DES LEGUMINEUSES CULTIVEES ET SPONTANEEES

ESPECES NOTES	AGENT PATHOGENE	ORGANE D'ISOLEMENT	DATE ET LIEU DE RECOLTE DU 1er ECHANTILLON
Pois= Pisum sativum	A.pisi A.pinodes A.pinodella	Tous les organes " "	
Pois Fourrager	A.pisi A.pinodes A.pinodella	Semences	IDGC (Siège) 1983
Haricot= Phaseolus vulgaris	A.phaseolorum A.pinodes A.pinodella	Gousses Semences Semences	1981 (EL-Harrach) 1982 (Annaba) 1982 (Annaba)
Pois Chiche= Cicer arie- tinum	A.rabiei A.pinodella	Tiges, Gousses Tiges	1984 (Sidi B.Abbes) 1983 (Sidi B.Abbes)
Fève = Vicia faba	A.fabae A.pinodella A. sp	Gousses Sem., Tiges, Feuill. Gousses	1981 (EL ANASSER) 1983 (IDGC, O.Smar) 1982, 1987 (Collo)
Lentille= Lens culinaris	A.lentis	Tiges Feuilles	1986 (Sidi B.Abbes)
Vesce = Vicia sativa	A.viciae	Tiges Feuilles Gousses	1981 (Collo)
Gesce= Lathyrus sp. Lathyrus arti- culatus	A.lathyri A.pinodella A. sp.	Tiges Tiges gousses	1981 (Figuier) 1987 (Collo)

Fig. 30: Carte d'Algérie indiquant les lieux d'isolement
des espèces d'Ascochyta



Nous rappelons que pour l'identification de cette espèce, nous avons eu recours aux descriptions faites par BOEREMA (1979).

3.1.2. DISCUSSION

Le tableau 6 récapitule les principales espèces d'*Ascochyta* spp., identifiées sur les Légumineuses cultivées ou spontanées en Algérie. Etant donné que pour la plupart d'entre-elles, il s'agit d'un premier isolement, l'organe végétal à partir duquel il a été isolé, la date et le lieu de prélèvement ou de provenance de l'échantillon ont été mentionnés dans ce tableau et ce, pour chaque plante hôte.

Ce travail d'identification constitue la première étude exhaustive réalisée en Algérie sur les anthracoses. Elle a permis de recenser les *Ascochyta* spp. présentes sur les Légumineuses en Algérie. La présence de certaines espèces, même à l'état spontané montre que cette région constitue une zone favorable de dispersion de ce groupe de champignons à l'échelle du bassin méditerranéen.

La distribution de ces espèces fongiques au niveau des plantes hôtes, permet de distinguer deux groupes d'*Ascochyta* spp. D'une part, des espèces que l'on n'a isolé et identifié qu'à partir d'un seul hôte, telles que *A. pisi* sur *Pisum sativum*, *A. fabae* sur *Vicia faba*, *A. lentis* sur *Lens culinaris*, *A. rabiei* sur *Cicer arietinum*, *A. viciae* sur *Vicia sativa*, *A. lathyræ* sur plusieurs espèces de *Lathyrus* (*L. ochrus*, *L. tingitanus* et *L. articulatus*).

D'autre part, les espèces comme *A. pinodes* et *A. pinodella* qui ont été isolées à partir de plusieurs plantes hôtes: *Pisum sativum*, *Cicer arietinum*, *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba* et *Pisum arvense*.

Si pour la plupart de ces espèces la transmission par les semences est bien établie (RICHARDSON, 1979, 1981 et 1983), le cas de *A. pinodes* isolé pour la première fois à partir de semences de Haricot (*Phaseolus vulgaris*), n'a pas été signalé par cet auteur. Il faut noter cependant que précédemment PUNITHALINGAM et HOLLIDAY (1972) ont considéré le Haricot comme pouvant être une plante hôte de l'*A. pinodes*, sans indiquer son mode de transmission.

A travers cette présentation, il apparaît que la majorité des espèces d'*Ascochyta* spp. constituent un groupe d'agents pathogènes très importants et que les altérations nécrotiques sur les différents organes (feuilles, tiges et gousses) sont comparables. Cette observation a justifié la nécessité d'étudier leurs caractères morphologiques et ontogéniques ainsi que la spécialisation parasitaire de ce groupe des Sphaeropsidales afin de tenter d'éclaircir une systématique assez confuse.

3.2. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ET ONTOGENIQUE DES Ascochyta spp. ISOLÉS A PARTIR DES LEGUMINEUSES

3.2.1. VARIATIONS MORPHOLOGIQUES ET CULTURALES

La comparaison entre les différentes espèces a porté sur les dimensions des spores, la taille des pycnides, ainsi que l'aspect culturel de la croissance des colonies en milieu artificiel.

3.2.1.1. DIMENSIONS ET TYPES DE SPORES

La forme générale des spores du genre *Ascochyta* étant de type cylindrique, la longueur et le diamètre des conidies ont été retenus comme critères de mensuration. Pour mettre en évidence d'éventuelles différences entre les espèces étudiées, les dimensions des spores ont été regroupées en classes selon LAMOTTE (1967). Pour chaque type de mesure, l'espèce est définie par la classe qui correspond au pourcentage de spores le plus élevé.

L'arrangement des différentes classes ainsi obtenues est représenté graphiquement par les histogrammes des figures 31 et 32. En abscisses, sont représentées les classes de longueur des spores (Fig. 31) ou de diamètre (Fig. 32); en ordonnées les espèces fongiques sont définies par le pourcentage le plus élevé de la classe considérée.

L'examen de ces histogrammes fait ressortir 4 principales classes de longueur respectivement 4,5; 7,6; 11,14 et 16 μm . Les deux classes ayant des spores de petite taille (longueur inférieure à 8 μm) regroupent les espèces *A. phaseolorum*, *A. rabiei* et *A. pinodella*. Les deux autres classes ont des spores de taille relativement plus grande dont la longueur

Fig. 31: Répartition graphique des souches d'*Ascochyta* spp. selon différentes classes de longueur de spores

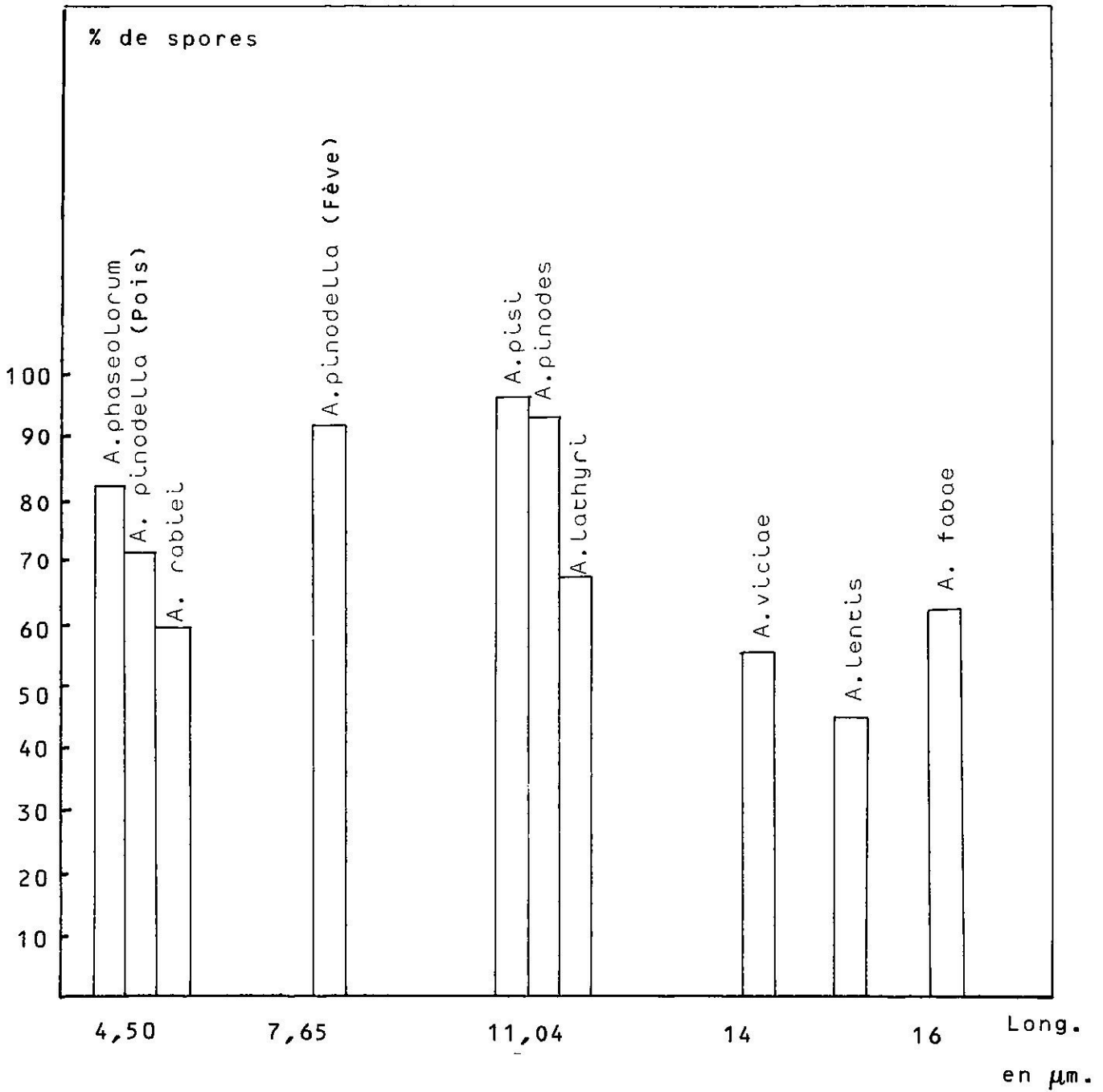
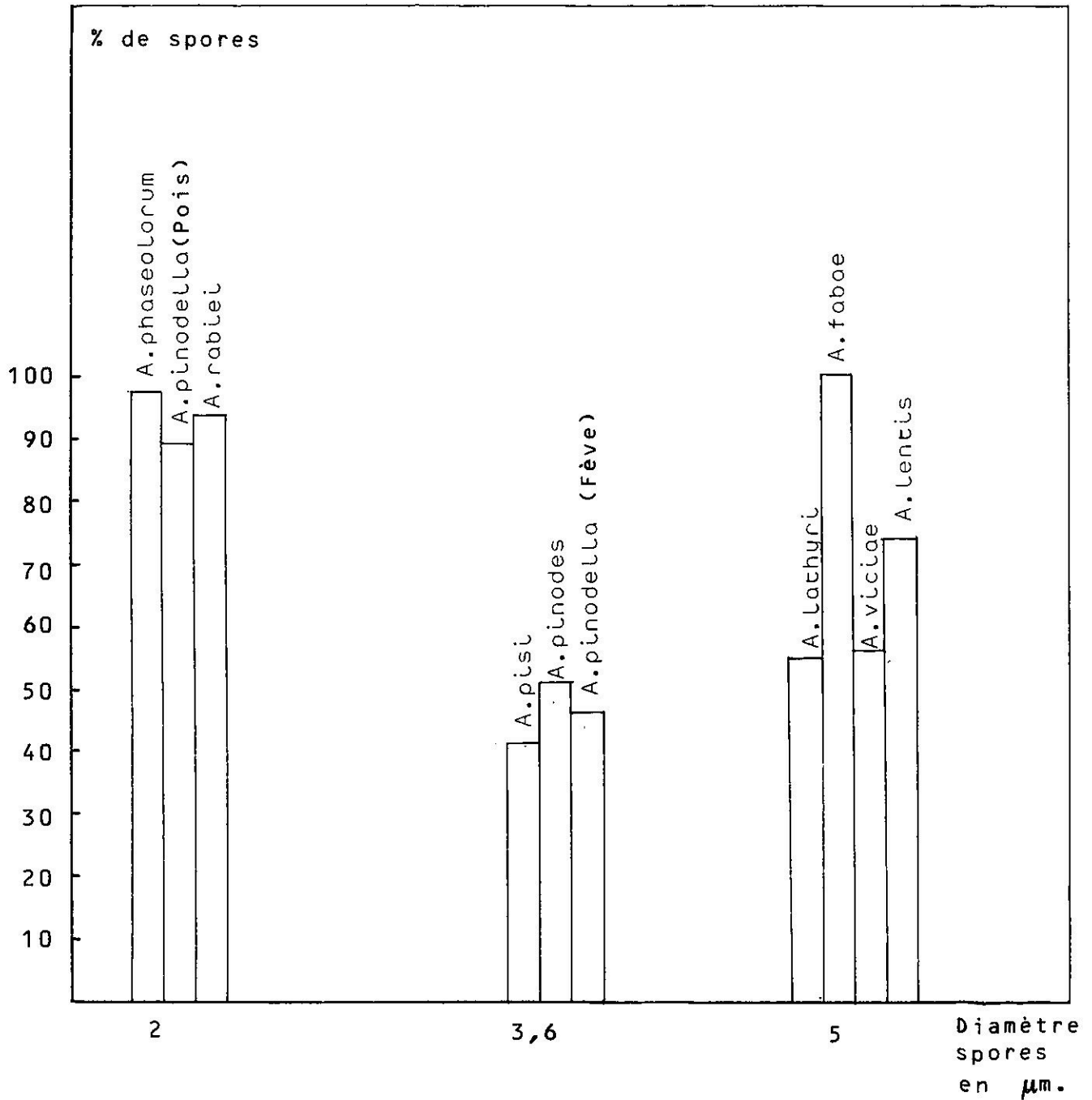


Fig. 32: Répartition des souches d'*Ascochyta* spp. selon différentes classes de diamètre des spores



est supérieure ou égale à 11 μm . (*A. pinodes*, *A. lathyri*, *A. pisi*, *A. viciae*, *A. lentis* et *A. fabae*).

En ce qui concerne le diamètre des spores, l'histogramme de la figure 32, permet de distinguer cette fois-ci trois classes principales réparties comme suit:

- Une première classe à spores de diamètre inférieur à 3,0 μm (*A. phaseolorum*, *A. pinodella* et *A. rabiei*);
- Une deuxième classe à spores de diamètre moyen voisin de 4,0 μm (*A. pisi* et *A. pinodes*);
- Enfin une troisième classe à spores de diamètre nettement plus grand, supérieur à 5 μm et pouvant dépasser les 7,0 μm (*A. lathyri*, *A. viciae*, *A. lentis* et *A. fabae*).

En ce qui concerne le type de spores, les *Ascochyta* spp. sont considérées comme des champignons à spores bicellulaires (figs 34 à 42). En réalité, certaines espèces peuvent avoir une forte proportion de spores monocellulaires, d'autres au contraire, ont des spores tricellulaires (deux cloisons) ou plus rarement quadricellulaires (trois cloisons); pour ces deux derniers cas les fréquences sont très faibles.

Le tableau 7 résume les observations faites sur les principaux caractères morphologiques des différentes espèces d'*Ascochyta* considérées. Les espèces à spores de petite taille (*A. pinodella*, *A. rabiei* et *A. phaseolorum*) présentent surtout des spores monocellulaires. Par contre, le groupe d'espèces à spores plus grandes (*A. fabae*, *A. lentis*, *A. viciae*, *A. lathyri*, *A. pisi*, *A. pinodes*) ont essentiellement des spores bicellulaires, avec des cas de spores pluricellulaires.

Fig. 34 : Pycnidiospores d'*Ascochyta pisi*. Les flèches indiquent la cloison centrale pour celles qui sont bicellulaires.

Fig. 35 : Pycnidiospores d'*Ascochyta lentis*; présence de deux types de conidies : celles qui sont bicellulaires ont une seule cloison centrale (➤), quelques unes sont tricellulaires (*) ont deux cloisons.

Figs. 36 et 37 : Deux formes de spores d'*Ascochyta pinodes*. La figure 36 présente des pycnidiospores essentiellement bicellulaires (➤) avec une seule cloison; la figure 37 montre des ascospores (➡) à l'intérieur d'un asque (➞).

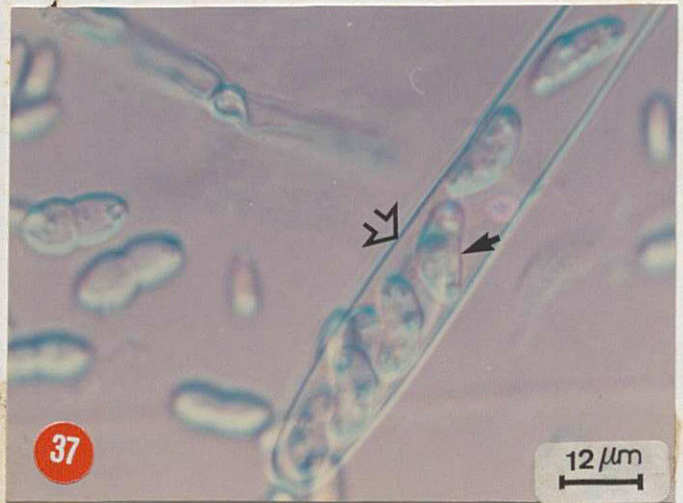
Fig. 38 : Pycnidiospores d'une espèce de *Phoma* sp. Isolée à partir du Pois; la majorité sont monocellulaires légèrement pointues aux deux extrémités (*), quelques unes sont bicellulaires avec une cloison centrale (➤)

Fig. 39 : Pycnidiospores d'*Ascochyta lathyri*; la plupart sont bicellulaires avec une cloison centrale (➤)

Fig. 40 : Pycnidiospores d'*Ascochyta fabae*; la majorité sont bicellulaires (➤), quelques unes peuvent être tricellulaires (*) avec deux cloisons.

Fig. 41 : Pycnidiospores d'*Ascochyta rabiei*. Cette espèce est caractérisée par beaucoup de conidies monocellulaires de taille très variable (*); quelques unes de taille plus grande sont bicellulaires.

Fig. 42 : Pycnidiospores d'*Ascochyta viciae*. Elles sont de forme et de taille plus homogènes et essentiellement bicellulaires (➤).





3.2.1.2. ASPECT CULTURAL DE LA CROISSANCE DES COLONIES

Pour l'identification des *Ascochyta* sur Légumineuses, en particulier, on fait souvent appel à d'autres caractères tels que l'aspect cultural. Au cours de nos isolements pratiqués à partir des différents organes des plantes cultivées (feuilles, tiges, gousses et graines), nous avons retenu ce critère pour identifier les isolats.

L'aspect général de la colonie est déterminé par la couleur des pycnides (claire ou sombre), par celle du cirrhe (blanc ou rose), par la présence ou l'absence de chlamydospores et par le type de mycélium (hyalin ou brun). Notons que sur milieu Mathur, la couleur foncée des colonies peut être nettement atténuée par l'obscurité. Ceci nous a amené à réaliser les isolements de ce groupe de champignons en présence de lumière. Les variations de tous ces critères ont été regroupés dans le tableau 7.

Trois groupes peuvent être ainsi distingués:

- Les colonies assez claires, blanc à rose-pâle, caractérisent les espèces de grande taille (*A. fabae*, *A. lentis* et *A. pisi*);
- La couleur vert olive de la colonie et l'abondance de chlamydospores, caractérisent surtout *A. pinodella* et à un moindre degré *A. viciae*.
- Enfin, les espèces dont la couleur de la colonie se situe entre les deux premières et qui constituent un groupe assez hétérogène (*A. pinodes*, *A. lathyri* et *A. rabiei*).

Tableau 7 : CARACTERES MORPHOLOGIQUES DES ESPECES
d' *Ascochyta* sp OBTENUES SUR MILIEU MATHUR

ESPECES	CARACTERES					ASPECT CULTURAL
	SPORES MONO-CELLULAIRES	SPORES BI-CELLULAIRES	SPORES PLURI-CELLULAIRES	OSTIOLE	CHLAMYDOSPORE	
<i>Ascochyta pisi</i>	-	+++	+	P	A	Rose(cirrhe rose)
<i>A. pinodes</i>	-	+++	-	P	P	Brun vert (couche blanche)
<i>A. pinodella (Pois)</i>	+++	+	-	P	P	Vert(cirrhe blanc)
<i>A. fabae</i>	-	+++	-	P	P	Brun(cirrhe rose)
<i>A. lentis</i>	-	+++	+	P	P	Vert(cirrhe rose)
<i>A. viciae</i>	-	+++	+	P	P	Vert(cirrhe rose)
<i>A. lathyri</i>	+	+++	+	P	P	Brun(cirrhe rose)
<i>A. phaseolarum</i>	+++	-	-	P	A	Marron clair
<i>A. rabei</i>	+++	+	-	P	A	Brun
<i>A. pinodella (Fève)</i>	++	+++	-	P	P	Vert
<i>A. pinodella Pois-chiche</i>	++	++	-	P	P	Vert

LEGENDES:

P = Présence
A = Absence
+++ = Majorité

++ = Beaucoup
+ = Peu
- = Négligeable

3.2.1.3. DIMENSIONS ET STRUCTURE MORPHOLOGIQUE DES PYCNIDES

Dans cette étude, nous avons retenu comme critère éventuel de reconnaissance des espèces l'appareil sporifère des *Ascochyta* spp. : la pycnide.

- DIMENSIONS DES PYCNIDES

Les résultats présentés dans le tableau 8 ainsi que les histogrammes correspondants (Fig. 43), montrent une grande variation intra et interspécifiques des dimensions des pycnides. Généralement, les espèces à grandes spores telles que *A. fabae*, *A. viciae* et *A. pisi*, ont des pycnides de grandes dimensions (143 à 300 μm). Par contre, les espèces à petites spores telles que *A. pinodella*, *A. rabiei* et *A. phaseolorum* ont plutôt des pycnides de dimensions assez réduites (63 μm à 103 μm).

- MORPHOLOGIE GENERALE DE LA PYCNIDE

Pour la plupart des champignons du groupe des Sphaeropsidales, les caractères morphologiques externes et ceux de l'appareil sporifère peuvent faciliter l'identification.

Extérieurement, toutes les espèces étudiées présentent des pycnides véritables pourvues d'un ostiole, plus ou moins bien différencié, par lequel s'échappent à maturité les conidies. Celles-ci sont contenues dans un mucilage visqueux (cirrhe) dont la couleur varie d'une espèce à l'autre (cf. tableau 7)

Fig. 43: Répartition graphique des souches d'*Ascochyta* sp selon les classes de diamètre des pycnides

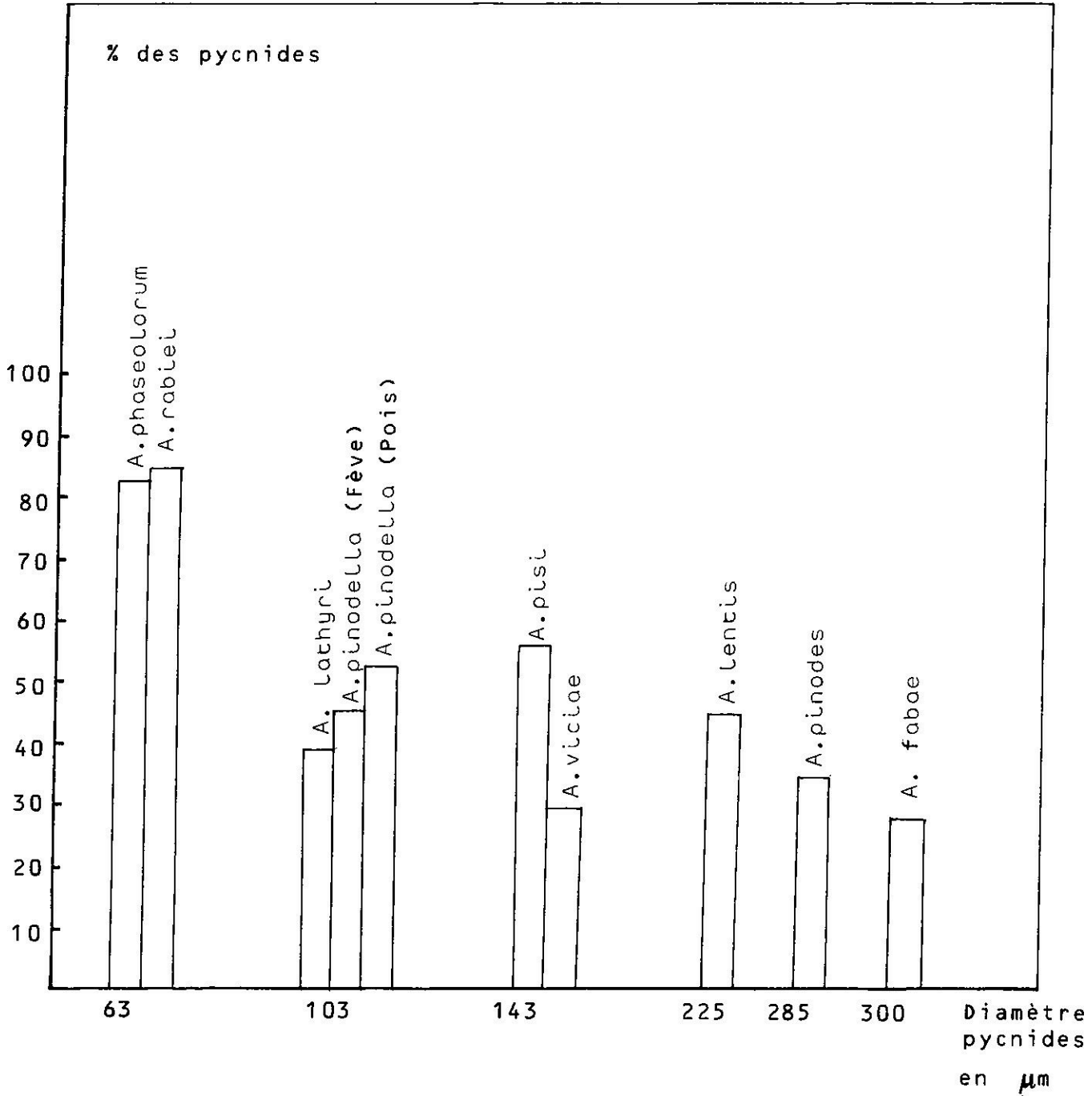


Tableau 8: Mensurations des spores et des pycnides d'*Ascochyta* spp. étudiées (milieu Mathur).

S O U C H E	LONGUEUR (μm)		DIAMETRE (μm)		TAILLE PYCNIDE	
	RANGÉE	MOYENNE	RANGÉE	MOYENNE	RANGÉE (μm)	MOYENNE (μm)
<i>Ascochyta pisii</i> (COLLO)	8,75-16,25	11,85	2,5 - 5	3,85	78-175,5	134,62
<i>Ascochyta pisii</i> (AL2 N84)	7,5 - 15	11,37	3,75-6,25	4,32	117-195	149,44
<i>Ascochyta plinodes</i> (D.P.)	7,5 - 16,25	10,35	2,5 - 5	3,32	85,8-234	174,51
<i>Ascochyta phaseolurum</i>	3,75-7,5	5,17	2,5-3,75	2,52	58,5-109,2	75,19
<i>Ascochyta</i> s.p.1 (Har.1)	5-11,15	8,0	2,5-5	3,45	58,5-175,5	115,12
<i>Ascochyta</i> s.p.5(Lathyr))	7,5 - 12,5	9,47	2,5-5	4,32	62,4-195	114,66
<i>Ascochyta</i> s.p.6(Fève IDGC3)	6,25-10	7,65	2,5-5,5	3,05	78,0-214,5	136,34
<i>Ascochyta fabae</i> (SOU.)	15-20	17,20	3,5-5	4,97	105,3-331,5	236,96
<i>Ascochyta</i> s.p. 7 (Vesce)	15-20	14,57	7,5	4,05	156,0-312	219,2
<i>Ascochyta plinodella</i> (ANNABA)	3,75-7,5	5,4	3,75	0,6	58,5-97,5	80,96
<i>Ascochyta robiei</i>	3,75-7,5	5,67	2-3,75	1,56	42,9-109,2	61,77
<i>Ascochyta lentis</i> (S.B.A.)	14,5-20,5	5,0	3,70-6,37	4,71	135,8-285,4	204,7

3.2.2. ETUDE DE L'ONTOGENIE DES CONIDIES

3.2.2.1. ETUDE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Les préparations routinières permettant l'identification des espèces d'Ascochyta, n'apportent pas toujours assez de détails, ni sur l'organisation interne de la pycnide, ni sur le mode de formation des conidies. En revanche, les observations effectuées sur coupes semi fines obtenues à partir du matériel fongique fixé et inclus dans de la résine, permettent de préciser ces aspects.

Les figures 45 à 51, montrent que l'organisation générale des pycnides est assez identique pour toutes les espèces considérées. La paroi pseudo-parenchymateuse de la pycnide est constituée le plus souvent de deux à trois assises cellulaires superposées. La forme des cellules les constituant est très variable au sein d'une même espèce.

Au niveau de l'assise la plus interne, les cellules sporogènes sont en coupe de forme généralement polyhédrique, montrant à leur sommet une extension plus ou moins grande, orientée vers la lumière de la pycnide. Il s'agit des conidies en cours de formation (Fig. 46) ou sur le point de se détacher (Figs 47 et 51).

A cette échelle, le mode de formation des conidies du type phialidique ou annellidique décrit pour certains Hyphomycètes n'est pas facilement identifiable pour aucune des espèces étudiées. Seule chez l'espèce *A. pisi* (Fig. 45a), il est mis en évidence une étape importante de l'initiation de la première conidie, qui pourrait représenter le type phialidique.

Fig. 44 : Initiation de la formation d'une pycnide chez *Ascochyta pisi*. La formation du stroma (Smy) résulte de l'enchevêtrement de plusieurs hyphes mycéliens (→).

Fig. 45 a : Portion d'une paroi de pycnide d'*Ascochyta pisi* (P pyc) avec deux cellules conidiogènes (Cc). La zone de réfringence (⇨) montre le détachement de la couche pariétale qui précède la formation de la future conidie; elle est caractéristique du type entéroblastique.

Fig. 45 b : Coupe transversale passant par l'ostiole d'une pycnide (⇨) d'*Ascochyta pisi*. Les cellules de la paroi pycnidienne (→) sont en continuité avec celles du col de l'appareil sporifère, constituant ainsi un véritable ostiole.

Fig. 46 : Aspect de la paroi pycnidienne (P pyc) chez *Ascochyta viciae*. Ce stade plus avancé du fonctionnement des différentes cellules conidiogènes (Cc), permet de distinguer, soit des conidies (Co) détachées, soit des conidies encore attachées.

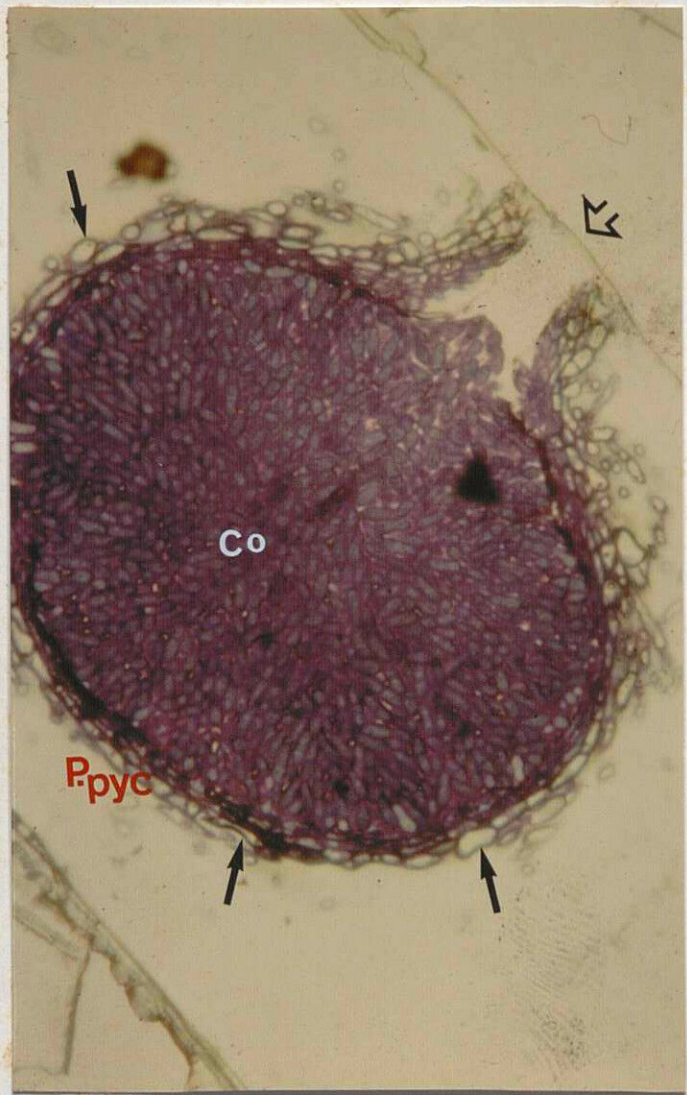
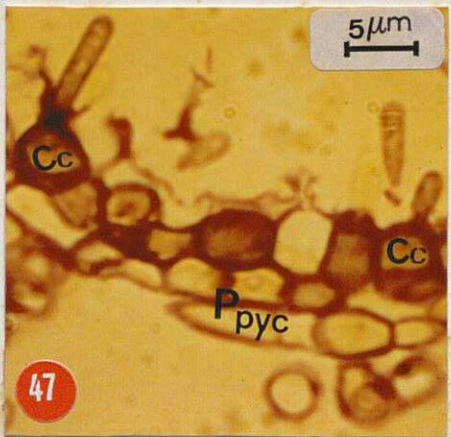
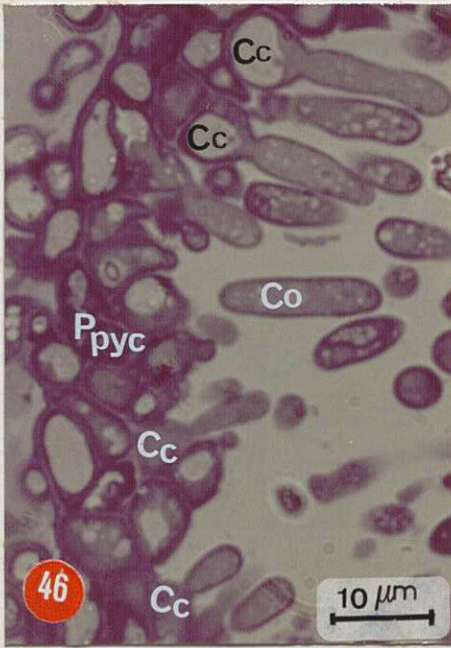
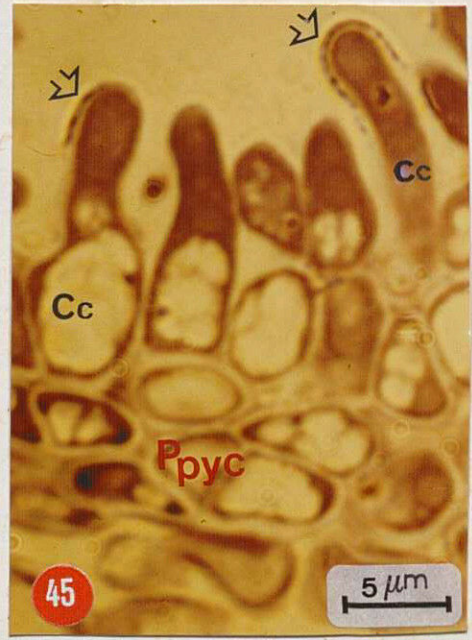
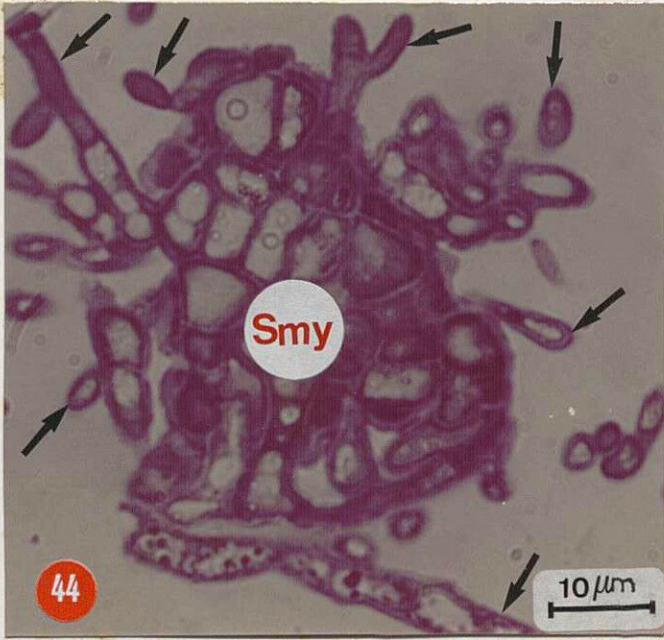
Fig. 47 : Paroi d'une pycnide (P pyc) d'*Ascochyta pisi* montrant deux cellules conidiogènes (Cc).

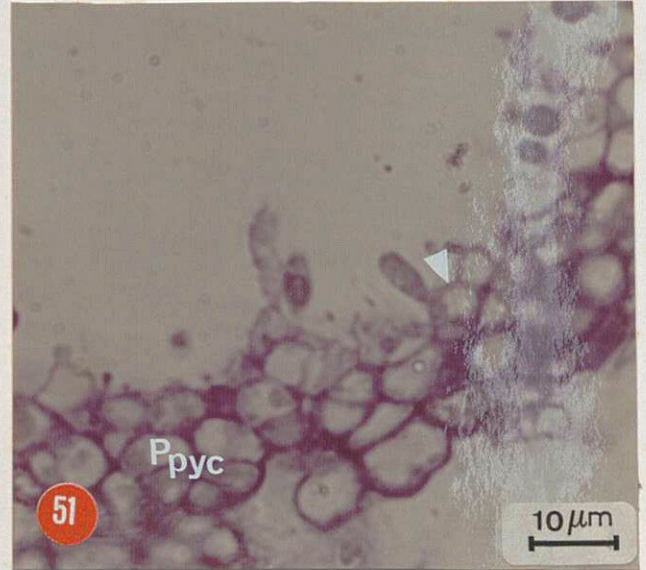
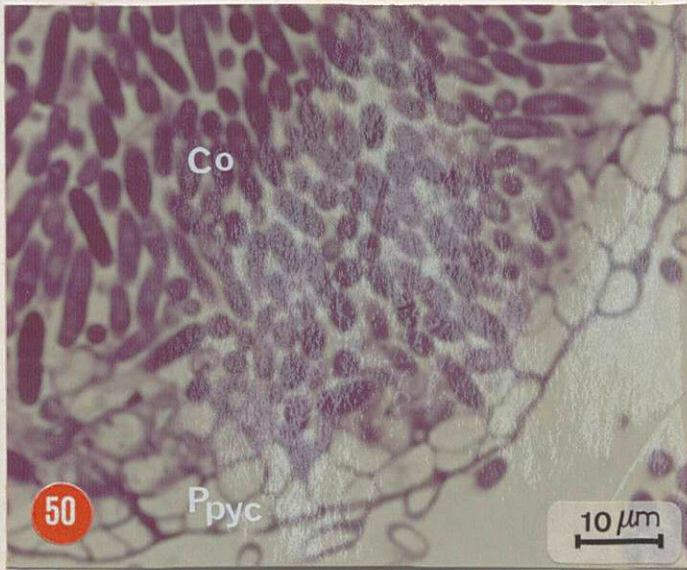
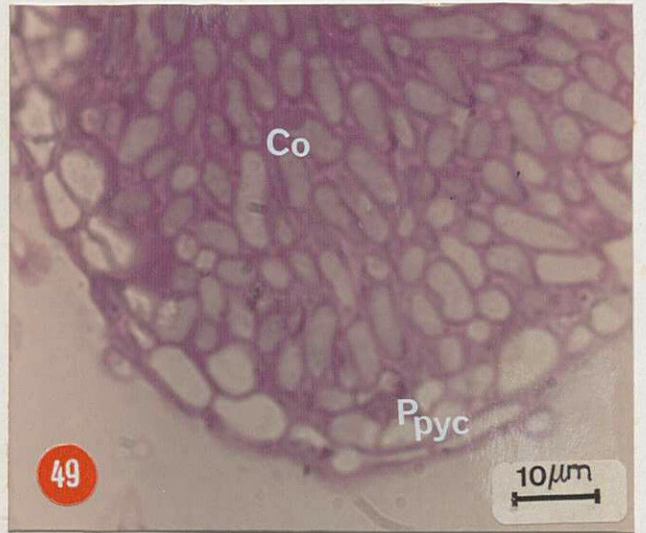
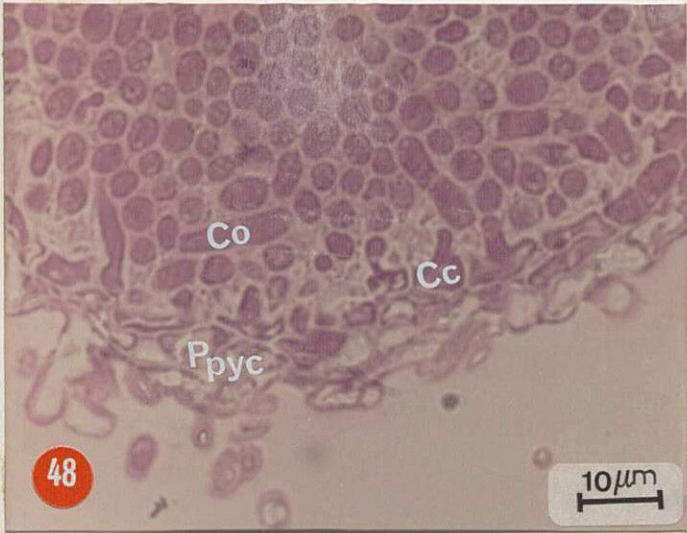
Fig. 48 : Aspect général en photomicrographie de la paroi pycnidienne (P pyc) chez *Ascochyta lentis*. Les cellules conidiogènes (Cc) et les conidies (Co) sont coupées longitudinalement ou transversalement.

Fig. 49 : Mêmes observations chez *Ascochyta rabiei*

Fig. 50 : Mêmes observations chez *Ascochyta lathyr*

Fig. 51 : Mêmes observations chez *Ascochyta pinodella*; la flèche blanche indique une cellule conidiogène avec une conidie sur le point de se détacher





R E S U M E

Le travail mené sur les anthracnoses a permis d'identifier les principales espèces d' *Ascochyta* inféodées aux légumineuses cultivées et spontanées en Algérie.

La caractérisation morphologique et culturale a confirmé leur hétérogénéité marquée et la confusion qui a souvent régné au sein de ce groupe de pathogènes. Par l'analyse des mécanismes ultrastructuraux de la conidiogenèse, il a été observé un mode de formation ontogénique du type phialidique, comparable à celui observé chez le genre *Phoma*.

L'aspect systématique des *Ascochyta* a été complété par une étude de la spécialisation parasitaire; en dehors de l'*Ascochyta* *pinodes* et *A. pinodella* les autres espèces ont montré une nette spécificité à l'égard de leur hôte d'origine.

Dans la partie consacrée à l'anthracnose du Pois causée par *A. pisi* Lib., l'étude des exigences biologiques et du pouvoir pathogène du champignon a permis de définir les conditions de transmission de la maladie ainsi que la variabilité génétique des isolats.

Les relations hôte-parasite ont été ensuite abordées chez un phénotype sensible et un résistant. A l'aide de la M.E.B., les aspects du processus de germination des conidies et de la pénétration de l'hôte ont été précisés, en relation avec la morphologie extérieure des cultivars et la présence des cires cuticulaires. Les événements ultrastructuraux intervenus après la pénétration, jusqu'à la formation de la nécrose, ont montré des différences entre les interactions compatibles et incompatibles. La nature cytochimique de certains métabolites secrétés par la plante ou le pathogène a été discutée.

Mots clés

- Anthracnoses, légumineuses,
- *Ascochyta* ssp. systématique, ontogénie,
- *P. sativum*, *A. pisi*, pouvoir pathogène, spécificité parasitaire,
- Relations hôte-parasite, interactions compatible et incompatible
- Ultrastructure, cytochimie.

On observe que la paroi de la cellule conidiogène est repoussée par la croissance de la future conidie. Cette figure pourrait faire penser à la définition traditionnelle de la phialide où les parois de la cellule conidiogène ne participent pas à la formation de la paroi de la conidie. Ce mode caractérise la définition d'une conidie née de manière entéroblastique. Mais nous restons encore prudent à ce stade d'observation, avant d'avoir abordé le processus au niveau ultrastructural.

Le recours à la microscopie électronique pour préciser davantage certains détails des modifications intervenus au niveau du conidiophore s'avère nécessaire. Ceci est d'autant plus nécessaire qu'au niveau des Sphaeropsidales, la conidiogenèse a été beaucoup moins étudiée que chez les Hyphomycètes.

3.2.2.2. ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE LA CONIDIOGENESE

L'étude de la conidiogenèse a été approfondie sur les principales espèces d'*Ascochyta* précédemment étudiées (*A. fabae*, *A. pisi*, *A. lentis*, *A. vicia*, *A. pinodes*, *A. pinodella*, *A. lathyri* et *A. rabiei*).

- DESCRIPTION DE LA PAROI PYCNIDIENNE

Deux types de cellules sont identifiables au niveau de la paroi pseudoparenchymateuse de la pycnide des espèces *Ascochyta* étudiées (Voir étude morphologique précédemment présentée). Dans tous les cas étudiés, l'assise cellulaire externe, continue et assez homogène, délimite la

cavité rigide de la pycnide (Figs 52 à 56). Elle est à l'origine d'une à trois assises successives de cellules, leur nombre peut varier d'une pycnide à l'autre et d'un endroit à l'autre au sein d'une même pycnide (Fig. 52).

Ces cellules composant la paroi de la pycnide sont de forme et de taille très différentes. La paroi de la pycnide provient de l'enchevêtrement mycélien pour former le stroma pycnidien (Fig. 44). Au cours de la maturation de l'appareil sporifère, il y a formation de l'ouverture naturelle, l'ostiole (Fig. 45b). A l'intérieur, une lyse probable des cellules centrales aboutit à la formation d'une cavité où s'accumulent les conidies.

Les couches de cellules les plus externes présentent une forte vacuolisation qui augmente de l'intérieur vers l'extérieur; les organites cellulaires sont beaucoup moins nombreux. Ces cellules montrant des signes de dégénérescence, jouent plutôt un rôle de support pour les cellules conidiogènes.

Au niveau de l'assise cellulaire la plus interne de la paroi de la pycnide, les cellules conidiogènes sont morphologiquement différentes de celles constituant les couches pariétales de la pycnide (Figs 54 et 55). Indépendamment des espèces, elles sont le plus souvent polyédriques confirmant ainsi nos observations en photonique. Elles sont le lieu d'une forte activité comme en témoigne la présence de nombreux organites cellulaires et particulièrement de mitochondries (Figs 57 et 60). C'est au niveau de cette assise cellulaire très active, qu'a lieu la conidiogenèse chez les Ascochyta et d'une manière générale chez la plupart des Sphaeropsidales.

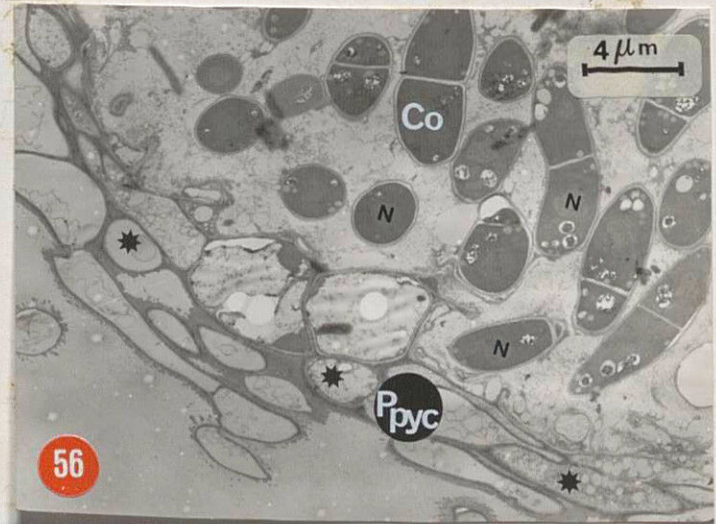
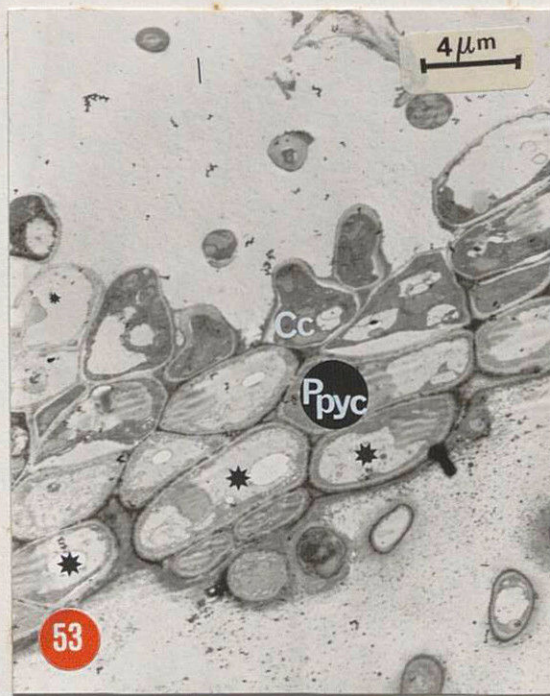
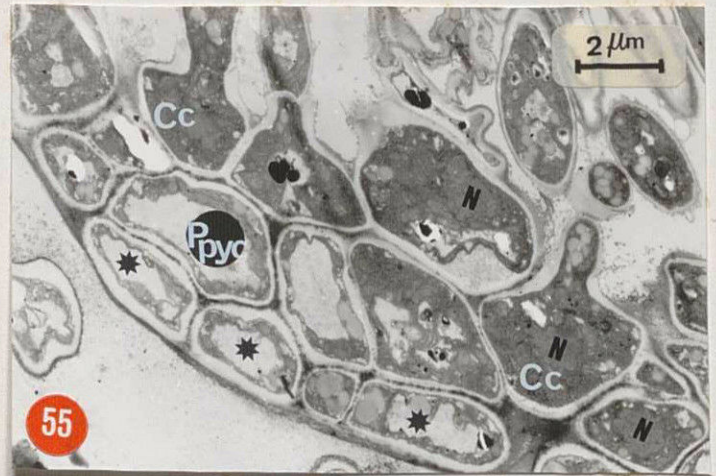
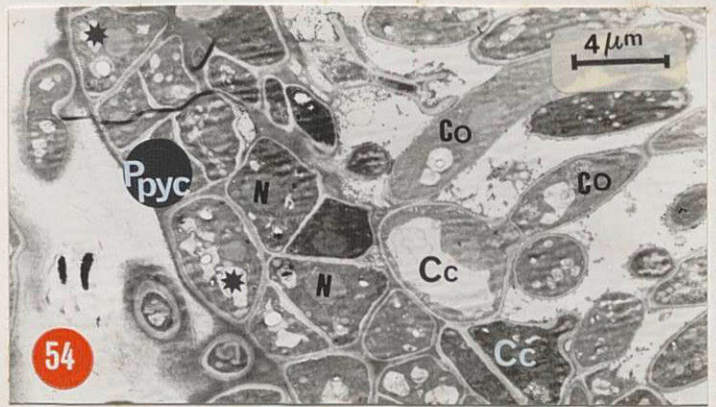
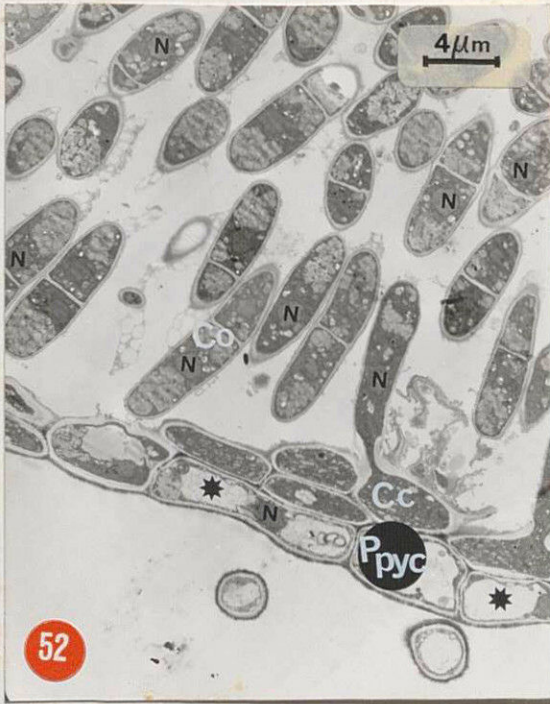
Fig. 52 : Aspect ultrastructural de la paroi pycnidienne chez *Ascochyta pisi*. La paroi est composée de deux types cellulaires : 1 à 2 couches de cellules composant la paroi proprement dite de la pycnide (Ppyc) indiquées par l'astérix (*) sont de forme allongée et souvent fortement vacuolisées. La couche la plus interne est constituée par les cellules conidiogènes (Cc) de forme polyédrique.

Fig. 53 : Aspect ultrastructural de la paroi pycnidienne (Ppyc) chez *Ascochyta pinodella*. Dans ce cas, le nombre de couches la composant est plus grand (jusqu'à quatre).

Fig. 54 : Aspect ultrastructural de la paroi pycnidienne (Ppyc) chez *Ascochyta fabae*. Même remarque que pour la figure précédente, mais dans ce cas le nombre de cellules conidiogènes (Cc) est plus élevé.

Fig. 55 : Aspect ultrastructural de la paroi pycnidienne (Ppyc) chez *Ascochyta lathyri*.

Fig. 56 : Aspect ultrastructural de la paroi pycnidienne (Ppyc) chez *Ascochyta pinodes*. Ce stade ne met pas en évidence les cellules conidiogènes précédemment observées.



- FONCTIONNEMENT DU SYSTEME CONIDIOGENE

La naissance d'une conidie à partir des cellules conidiogènes est sensiblement identique pour toutes les espèces d'Ascochyta. Nous reconnaissons plusieurs étapes dans le processus de formation des conidies.

INITIATION ET FORMATION DE LA PREMIERE CONIDIE

Cette étape importante dans la caractérisation du type ontogénique pour une espèce donnée, n'a pu être observée de façon très évidente. Néanmoins, l'observation de la figure 57 obtenue dans le cas d'*A. pinodella* montre le début de la conidiogenèse. Cette initiation semble commencer par une rupture d'un côté de la paroi de la cellule conidiogène; on remarque assez nettement une lyse des différentes couches pariétales qui doit aboutir à un détachement d'une portion de la paroi. Le plus souvent, cette dernière reste attachée comme le montre les figures 60 à 62.

Ce processus précise et confirme les observations déjà faites en photonique sur *A. pisi* Lib. (Fig. 45a).

FORMATION SUCCESSIVE DES AUTRES CONIDIES

Un grand nombre d'observations effectuées sur plusieurs isolats d'une même espèce et sur des espèces différentes, ont permis d'observer la formation répétée de plusieurs conidies à partir d'une même cellule conidiogène. Nous avons déduit ce type de fonctionnement ontogénique par la présence au niveau du locus de formation des conidies, de structures lamellaires (Fig. 59 et 60) Le nombre de strates correspondrait à celui des conidies détachées.

Fig. 57 : Détail d'une cellule conidiogène (Cc) d'*Ascochyta pinodella*. La cellule n'a pas produit encore de conidies comme l'indique le point de rupture (◄►) de la couche pariétale. La présence de nombreuses mitochondries (M) témoin d'une forte activité cellulaire.

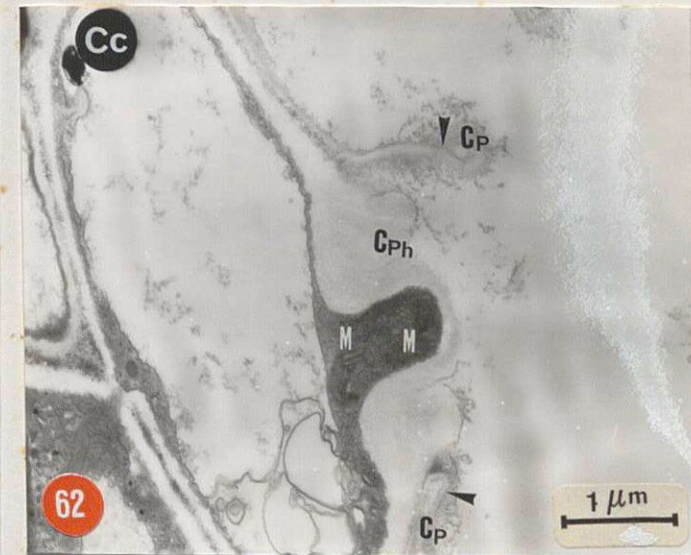
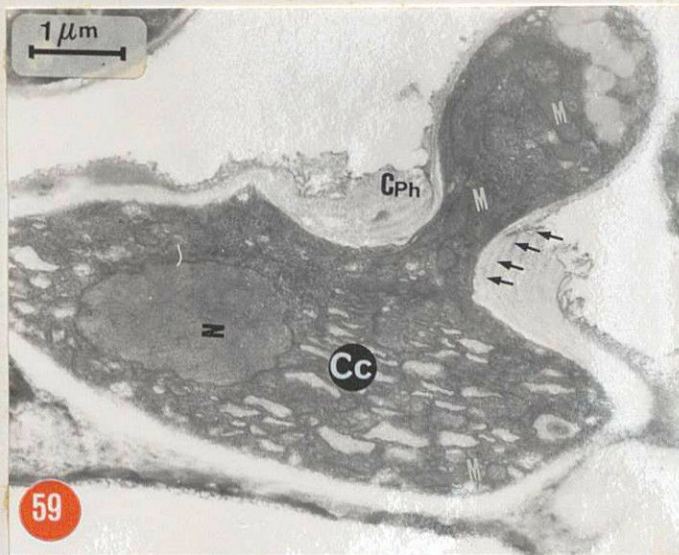
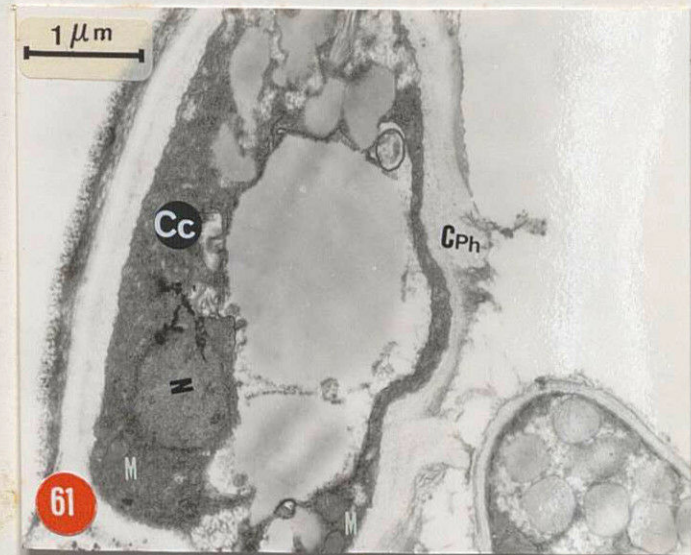
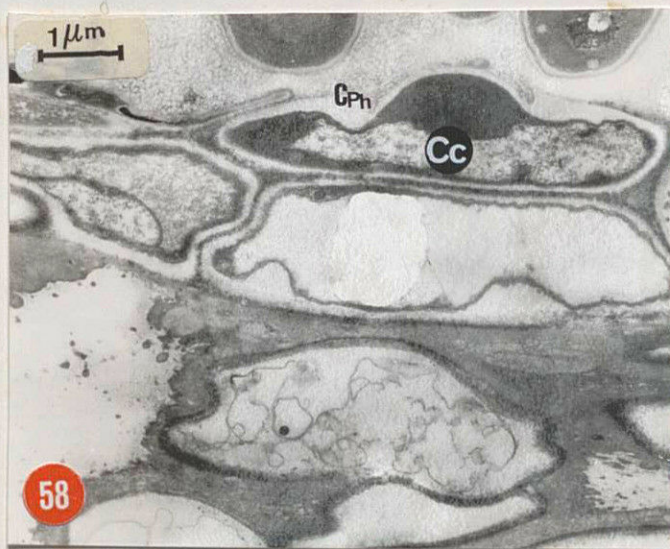
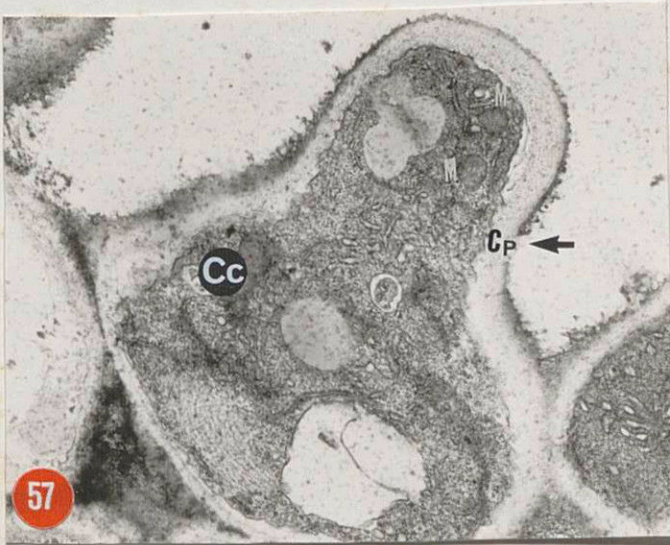
Fig. 58 : Aspect d'une autre cellule conidiogène (Cc) chez la même espèce *A. pinodella*. L'épaississement du col de la phialide (Cph) indique qu'il y a eu production de plusieurs conidies.

Fig. 59 : Aspect ultrastructural d'une cellule conidiogène (Cc) chez *Ascochyta pisi*, typiquement phialidique. Le col phialidique (Cph) est caractérisé par la formation successive de plusieurs strates (→) correspondant au nombre de conidies formées. Noter la présence d'un noyau (N) et de plusieurs mitochondries (M).

Fig. 60 : Cellule conidiogène (Cc) d'un autre isolat d'*A. pisi*. On retrouve les mêmes aspects que sur la figure précédente. Noter les restes (►) de la couche pariétale de la cellule conidiogène (Cc) qui se sont formés lors du détachement de la première conidie.

Fig. 61 : Aspect d'une autre cellule conidiogène (Cc) de la même espèce avec un col phialidique (Cph) moins caractéristique que les deux précédents.

Fig. 62 : Aspect ultrastructural d'une cellule conidiogène (Cc) d'*Ascochyta lathyri*. Col phialidique (Cph) très épais, auquel sont attachés des deux côtés les restes des couches pariétales (Cp) de la cellule conidiogène fortement vacuolisée.



Ce type de structure largement décrit par les auteurs (ROQUEBERT, 1976, 1977, 1982; COLE et SAMSON, 1979; MINTER, 1982; KENDRICK, 1971), répond à la définition du type ontogénique phialidique. Ce mode de formation phialidique est confirmé par le fait que le conidiophore (phialide dans ce cas) ne présente aucune croissance après le détachement des conidies. De même, aucune annellation superposée n'a été observée au niveau de la cellule conidiogène.

De plus, on a déjà montré que la première conidie est entéroblastique; les forts grossissements des observations précédentes au niveau du col des phialides (Fig. 59 et 60) montrent qu'il n'y a pas de continuité entre les couches externes de la cellule conidiogène et la paroi de la conidie. Au contraire, à chaque fois les couches pariétales internes de la cellule conidiogène se prolongent autour de la spore.

Tous ces caractères de formation de la conidie nous permettent de considérer que la conidiogenèse chez les espèces *Ascochyta* étudiées est du type phialidique.

DETACHEMENT DES CONIDIES

Les étapes de cloisonnement entraînant le détachement des conidies sont illustrées par les figures 63 à 70. Souvent, la libération de la conidie est provoquée par l'initiation de la suivante (Fig. 69). Il apparaît que dans tous les cas et pour toutes les espèces, la conidie semble être détachée avant même d'avoir atteint sa maturité. C'est le cas pour la majorité des espèces à conidies bicellulaires où les

Fig. 63 : Aspect de deux cellules conidiogènes (Cc) chez *Ascochyta fabae* avec des conidies sur le point de se détacher (►). La conidie entièrement visible est monocellulaire et uninucléée.

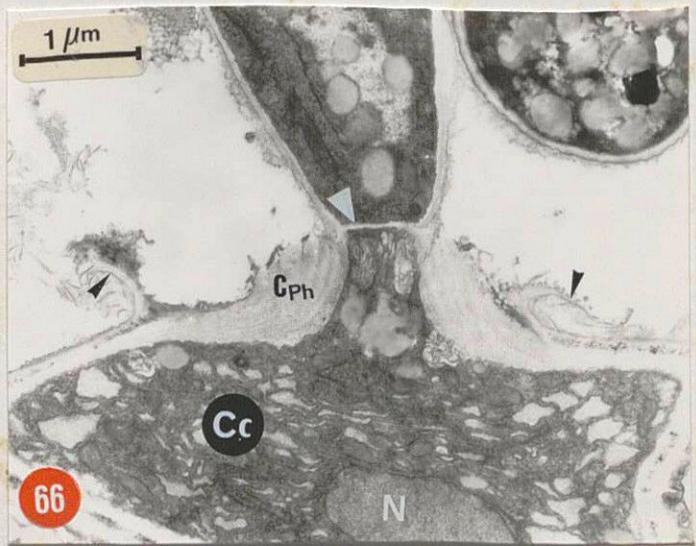
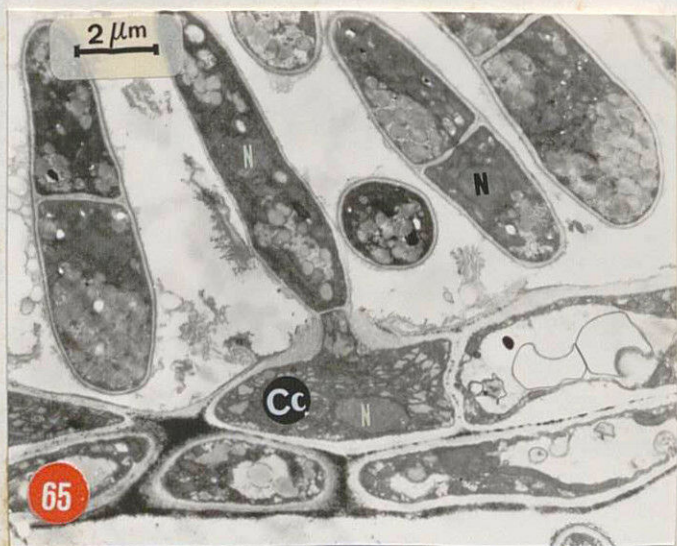
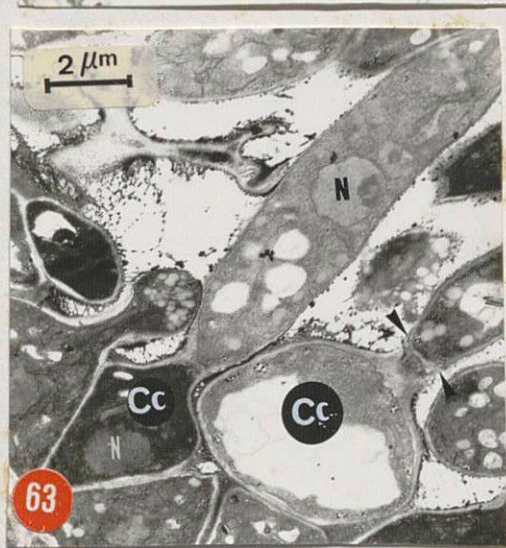
Fig. 64 : Détail montrant notamment la zone de rupture (►) et la richesse en mitochondries (M) de la cellule conidiogène (Cc).

Fig. 65: Conidie d'*Ascochyta pisi* encore attachée à la cellule conidiogène (Cc). Celle-ci est monocellulaire alors que les conidies détachées sont bicellulaires.

Fig. 66 : Détail de la figure précédente. La flèche blanche souligne le niveau de détachement de la conidie. Noter les restes de la couche pariétale (►) et le col phialidique (Cph)

Fig. 67 à 69: Aspect de plusieurs cellules conidiogènes montrant les conidies qui leur sont encore attachées; à ce stade les conidies sont toujours uninucléées. Ces observations obtenues par le test PATAg, indiquent l'organisation et la nature polysaccharidique des différentes couches pariétales.

Fig. 70: Détail du col phialidique (Cph) ainsi que de la zone de rupture (►) qui va permettre à la conidie de se détacher. Noter également comment celle-ci est repoussée par la nouvelle conidie (*).



conidies sur le point d'être détachées, sont unicellulaires; la septation n'intervient que par la suite.

SEPTATION ET COMPORTEMENT NUCLEAIRE

Au cours de nos recherches sur le processus ontogénique des conidies, une attention particulière a été portée sur les modalités de leur cloisonnement, ainsi que leur comportement nucléaire Figs 71 à 75. Pour toutes les espèces à tendance bicellulaire, la septation complète a lieu après le détachement de la spore. Cette étape est généralement précédée par la migration d'un noyau vers les deux pôles de chaque conidie (Fig. 71); en même temps on peut observer l'initiation de la future cloison mais dans tous les cas la septation intervient durant la dernière phase de la conidiogenèse. Au voisinage immédiat du pore de la cloison, on distingue souvent la présence des corps de WORNIN (Fig. 74).

Selon les espèces et les isolats, chaque noyau peut se diviser à son tour pour aboutir à des cellules binucléées. Une étude complémentaire pour préciser l'état nucléaire des conidies a été menée, par une coloration des noyaux à l'aide de la méthode au GIEMSA. La variabilité du patrimoine nucléaire des conidies issues d'un seul noyau au départ est illustrée par les figures 76 à 81; on observe nettement la présence d'un à deux noyaux par cellule.

Cet ensemble d'observations montre qu'au niveau d'une même spore tous les noyaux ont une même origine.

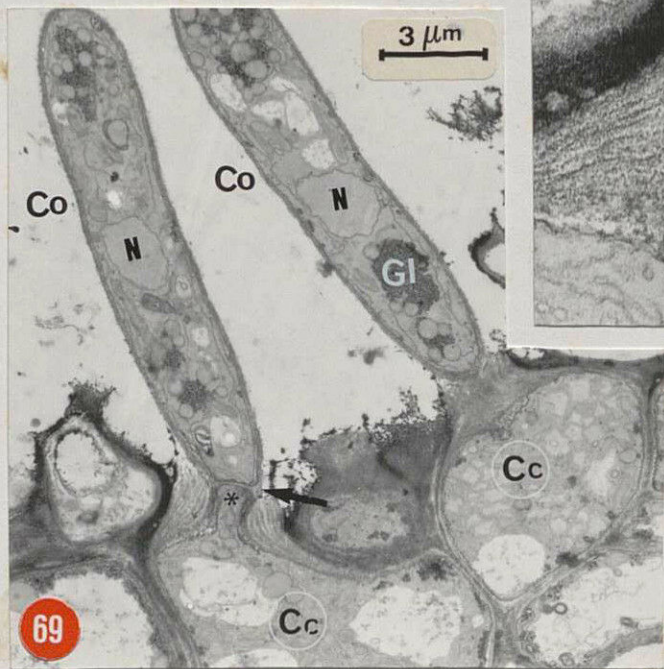
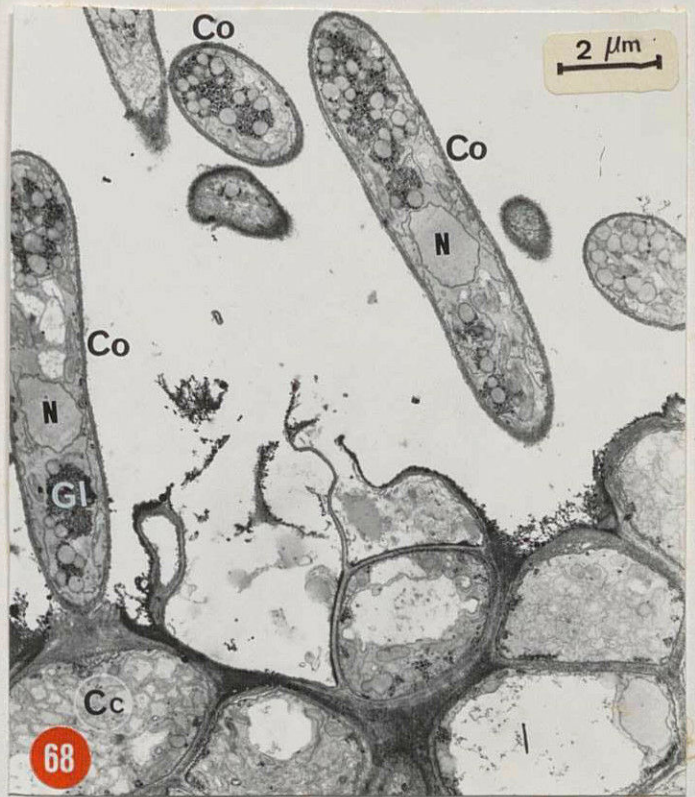
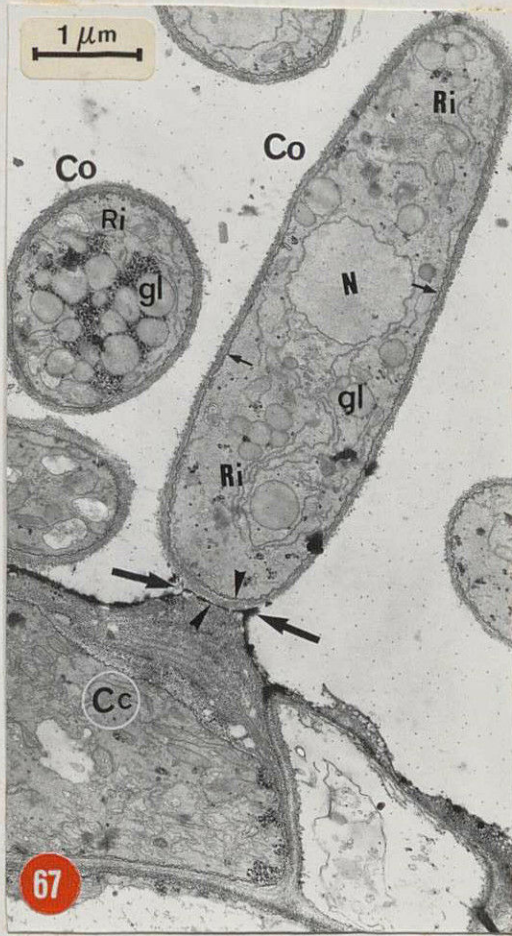



Fig. 71 : Initiation de la formation de la cloison conidienne. On distingue nettement une invagination () des couches pariétales de manière centripète. Après division, les noyaux ont migré vers les deux extrémités de la conidie, de part et d'autre de la future cloison.


Fig. 72 : Stade plus avancé de la septation montrant l'allongement de la cloison (). Les flèches indiquent le point initial de formation de la cloison. Noter la richesse en mitochondries (M) de cette zone.

Fig. 73 : Détail de la cloison après un PATAg. Ce test permet de distinguer la nature polysaccharidique des différentes couches pariétales de la conidie ainsi que celles de la cloison.


Fig. 74 : Stade final de la formation de la cloison. On note la présence d'un pore (flèche blanche auprès duquel se trouve un corps de Worthing (Wo) ()) et la structure feuilletée de la cloison.

Fig. 75 : Aspect d'une conidie d'*Ascochyta fabae* ayant atteint sa maturité. Elle possède des noyaux, des réserves importantes (globules lipidiques (gl) et glycogène (Gl)).

Fig. 76 : Coloration nucléaire au Giemsa. Pour cet isolat d'*Ascochyta pisi*, les conidies sont essentiellement mononucléées.

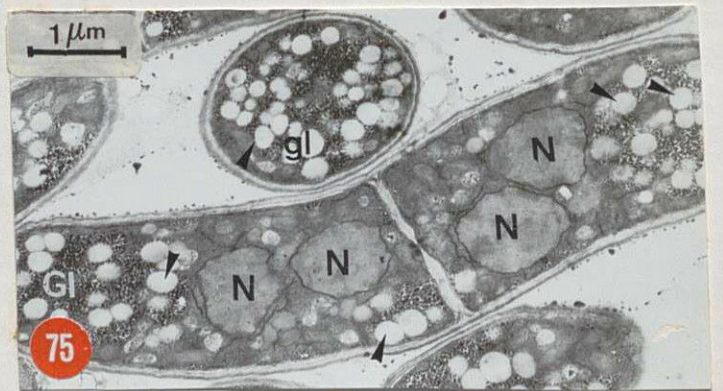
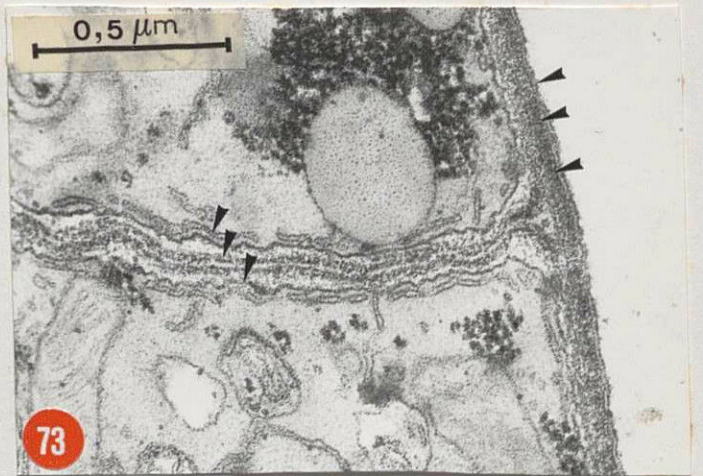
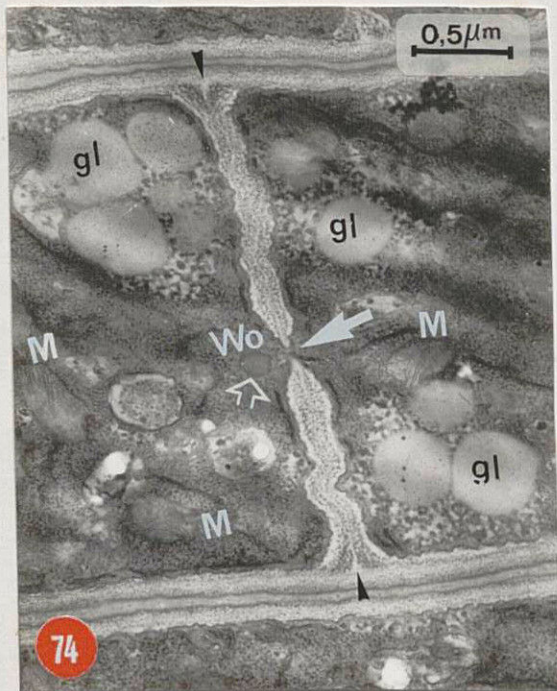
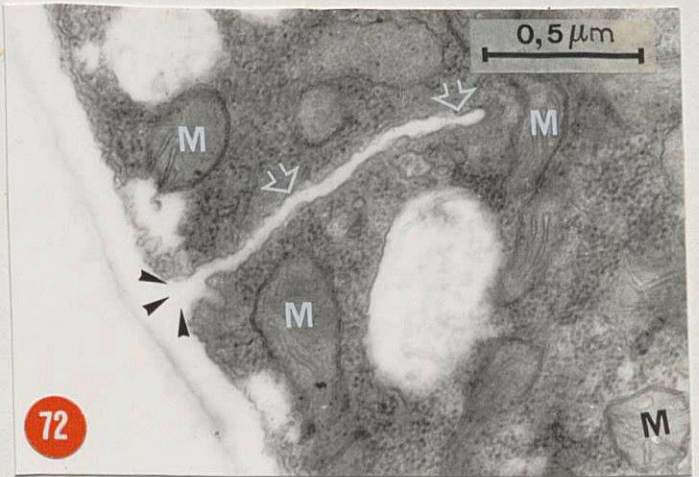
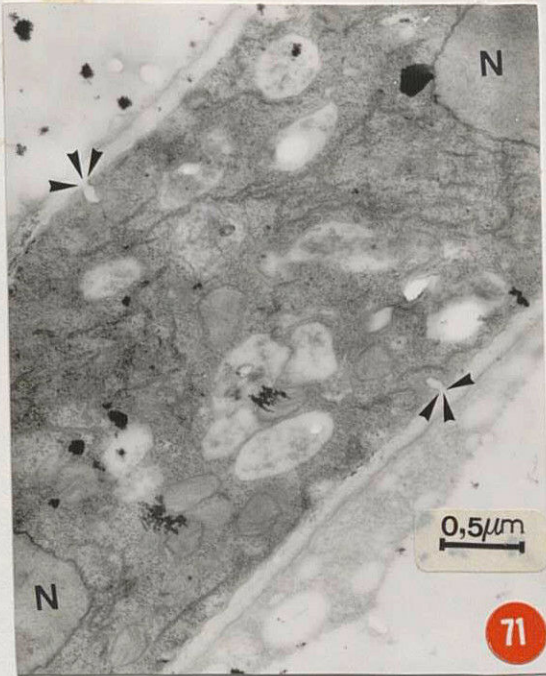
Fig. 77 : Coloration nucléaire au Giemsa réalisée sur un autre isolat d'*Ascochyta pisi*. Dans ce cas les conidies sont plutôt binucléées.

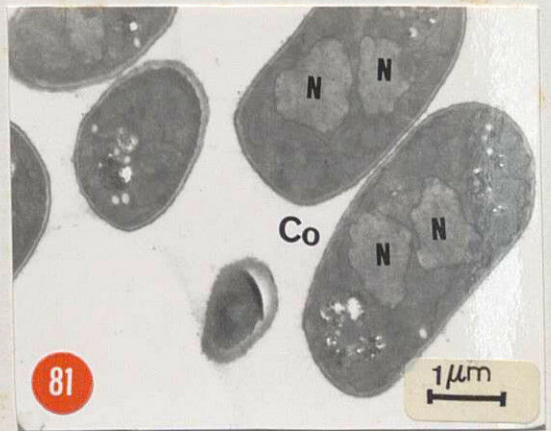
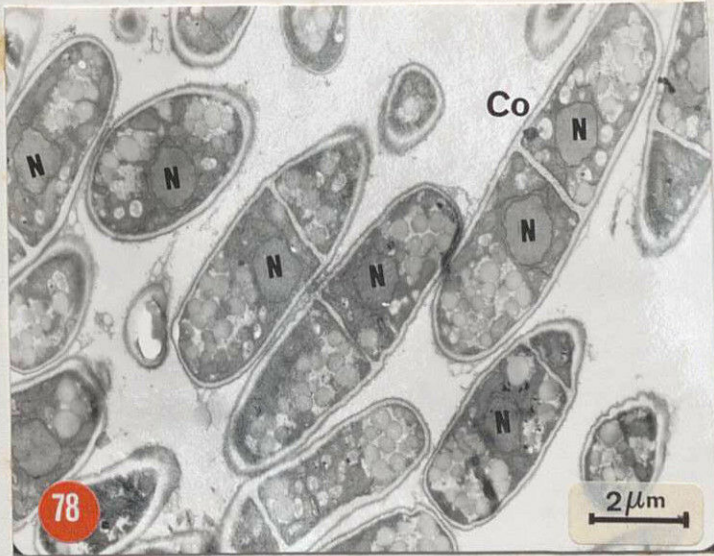
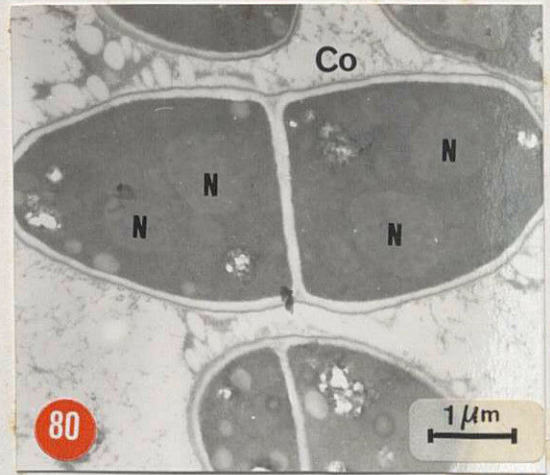
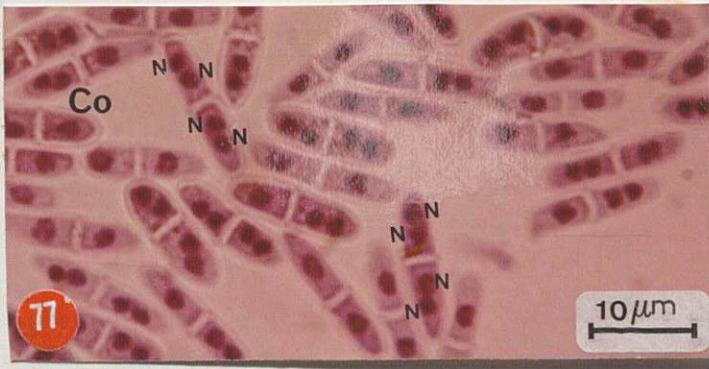
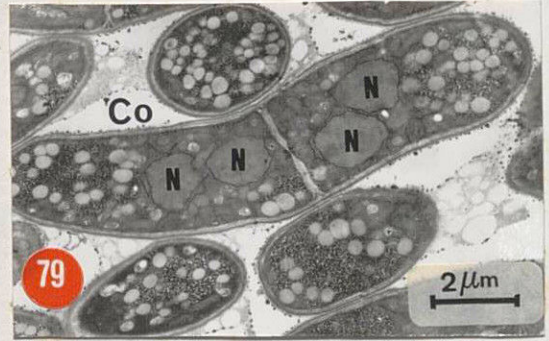
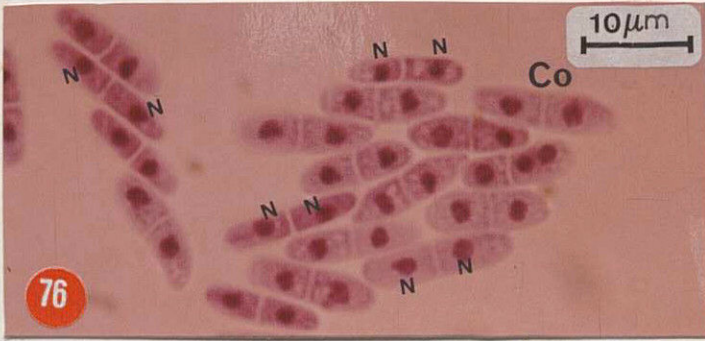
Fig. 78 : Aspect ultrastructural des conidies mononucléées (Co) d'*Ascochyta pisi*. Certaines conidies sont coupées transversalement. (à légenda)

Fig. 79 : Aspect ultrastructural des conidies (Co) binucléées d'*Ascochyta fabae* en coupe transversale ou longitudinale.

Fig. 80 : Aspect ultrastructural des conidies (Co) d'*Ascochyta pinodes*. Comme pour la figure précédente, les cellules sont binucléées.

Fig. 81 : Aspect ultrastructural des conidies (Co) d'*Ascochyta rabiei*. Au niveau de cette espèce les conidies sont monocellulaires et binucléées.





3.2.3. DISCUSSION

L'étude morphologique des espèces d'*Ascochyta* inféodées aux Légumineuses, a confirmé la variabilité très marquée qui caractérise en particulier la forme et la dimension des conidies. Ceci explique la confusion qui a longtemps régné au sein de ce groupe de pathogènes. Dans certains ouvrages (ROGER, 1958), on trouve même l'erreur qui consiste à considérer le *Mycosphaerella pinodes* comme la forme parfaite de l'*Ascochyta pisi*, alors que ces deux espèces ont été reconnues différentes dès 1927 (JONES, 1927; HARE et WALKER, 1944). De même, certains auteurs (SPRAGUE, 1929; LEACH, 1965) parlent de l'isolement à partir de la Vesce (*Vicia sativa*) de l'*Ascochyta pisi*, agent reconnu de l'antracnose du Pois. Cette confusion est d'autant plus inattendue qu'en milieu de culture, ces deux espèces se comportent différemment, les spores de l'*A. viciae* étant relativement plus grandes.

D'autres auteurs ont introduit des modifications de nomenclature au niveau de quelques espèces se rapprochant du genre *Phoma*. Dans ce sens, BOEREMA et al., (1965) ont proposé pour *A. pinodella* le nouveau nom de *Phoma medicaginis* var. *Pinodella*. Depuis, cette dernière dénomination est de plus en plus utilisée par les auteurs (BOEREMA, 1976 et 1979; RICHARDSON, 1979). Par ailleurs, en comparant *Ascochyta phaseolorum* avec le *Phoma exigua*, ce même auteur (BOEREMA, 1972) a considéré ces deux espèces comme étant des synonymes.

Les quelques modifications apportées à la classification du genre *Ascochyta* devraient concerner à notre avis d'autres espèces. C'est le cas notamment de l'*A. roblei* ayant la presque totalité de ses conidies monocellulaires, devrait être considéré aussi comme un *Phoma*

Le genre *Ascochyta* étant davantage réservé aux espèces à pycnides dont les conidies sont hyalines et typiquement bicellulaires. Par ailleurs la variabilité morphologique du genre *Ascochyta* a donné lieu à une multiplicité de dénomination des espèces rencontrées sur Légumineuses. Notre étude confirme alors l'intérêt d'une caractérisation de l'aspect cultural des colonies en milieu artificiel comme critère complémentaire d'identification des espèces d'*Ascochyta*. L'exemple des trois espèces responsables de l'antracnose du Pois est assez significatif pour leur comportement très différent en culture *in vitro*.

ALLARD et al. (1978) ont déjà signalé que la distinction entre ces trois espèces (*A. pisi*, *A. pinodes* et *A. pinodella*), peut être faite macroscopiquement d'après l'aspect de la culture sur milieu MATHUR. Comme autre critère de différenciation, CHAMPION (1981) mentionne la disposition en ligne des pycnides chez *A. pinodes*. Actuellement, il y a une tendance pour une caractérisation biochimique de ces trois espèces (ESKANDARI, et al. 1987)

Par contre, les données morphologiques et structurales de la pycnide, ne nous ont pas permis de déceler des différences fondamentales entre les espèces d'*Ascochyta*. Les variations importantes obtenues au sein d'une même espèce, concernent aussi bien les dimensions des pycnides, que le nombre de couches qui composent leur paroi.

De ce fait, ce critère pris en considération par EL SHANAWANI et USPENSKAYA (1978), ne semble pas être caractéristique d'une espèce donnée. Le nombre de quatre à cinq couches attribuées par ces deux auteurs à l'*A. pisi*

est exagéré par rapport aux résultats que nous avons obtenus. Dans de nombreux cas, la paroi pycnidienne n'est composée que de deux à trois assises seulement.

En revanche, l'étude de la conidiogenèse de la plupart des espèces d'Ascochyta a montré une homogénéité marquée du mode de formation des conidies. Du point de vue de l'ultrastructure des cellules conidiogènes, les espèces étudiées sont, dans leur ensemble, tout à fait comparables soit à certains genres de Coelomycètes, tels que *Phoma fumosa* (SUTTON et SANDHU, 1969), *Phoma pomorum* (JONES, 1975) et *Marsoniella juglandis* (ROQUEBERT et FAYRET, 1982), soit à des espèces d'Hyphomycètes telles que *Trichoderma Saturnisporum* (HAMMILL, 1974), *Aspergillus clavatus* (HANLIN, 1972) et *Aspergillus tamari* (ROQUEBERT, 1977). Toutes ces observations correspondent aux représentations schématiques de la formation et du fonctionnement d'une cellule sporogène du type phialidique (SUBRAMANIAN, 1971; SUTTON, 1971; BOEREMA et BOLLEN, 1975; ROQUEBERT, 1976; COLE et SAMSON, 1979; COLE, 1981; HAMMILL, 1981; MINTER et al, 1982).

L'examen approfondi de la paroi des cellules conidiogènes a montré que la formation successive des conidies s'effectue de manière entéroblastique. En effet, les couches externes de la paroi de la phialide ne participent pas à l'élaboration de la paroi conidienne. Ce sont plutôt les couches les plus internes qui sont impliquées dans ce processus. Cette succession des conidies s'accompagne toujours d'un élargissement du col de la cellule conidiogène. Il s'ensuit alors des modifications structurales matérialisées par un aspect lamellaire de cette zone, généralement reconnu comme caractéristique du type phialidique chez d'autres champignons (ROQUEBERT, 1977).

Par contre, certains caractères considérés comme déterminants du type annellidique n'ont pas été mis en évidence au cours de nos observations. Il s'agit notamment de la croissance en longueur de la zone sporogène du conidiophore dite "prolifération percurente" et de la présence de restes cicatriciels laissés après formation d'une nouvelle conidie (SUTTON et SANDHU, 1969; HUGHES, 1971; HAMMILL, 1972 a et b; COLE et SAMSON 1979; COLE, 1981).

Enfin, parmi les autres caractères nouvellement admis pour différencier le type phialidique du type annellidique (COLE et SAMSON, 1979; COLE, 1981; MINTER et al. 1982), les événements accompagnant la septation, détachement et cloisonnement des conidies, sont confirmés par nos observations. De même, la présence des corps de WORNIN n'a pas été notée de part et d'autre de la cloison permettant le détachement des conidies, alors que ces organites ont été observés au niveau de la septation pour les conidies déjà détachées. De plus, mais de façon moins évidente, la disposition des différentes couches qui interviennent dans le processus de détachement des conidies nous rappelle le type phialidique.

Cet ensemble de données montre que les mécanismes ultrastructuraux de la conidiogenèse chez le genre *Ascochyta* sont analogues à ceux observés pour le genre *Phoma*. Il apparaît donc difficile d'accepter les différences fondamentales qui ont été rapportées par BOEREMA et BOLLEN (1975), attribuant le mode annellidique au premier groupe de champignons et le mode phialidique au deuxième. Notons toutefois, d'une manière générale, que les phialides observées ont été plus facilement caractérisées pour les espèces à grandes spores typiquement bicellulaires (*A. fabae* et *A. pisi*). Les espèces présentant des petites conidies, typiquement

monocellulaires (*A. pinodella*, *A. phaseolorum* et *A. rabiei*), ont été plus difficiles à caractériser. Toutefois, les observations réalisées sur *A. pinodella* montrent que les cellules sporogènes sont plutôt phialidiques qu'annellidiques.

D'un point de vue pratique, la caractérisation en ultrastructure de la conidiogenèse reste peu accessible et d'une efficacité souvent douteuse.

En résumé, dans cette première partie, nous avons réussi à caractériser les *Ascochyta* des Légumineuses par leur conidiogenèse phialidique. Par ailleurs, les descriptions morphologiques et culturales nous ont conduit à distinguer trois principaux groupes parmi les neuf espèces étudiées. Il nous a donc paru nécessaire de compléter notre travail de systématique par une étude de la spécificité parasitaire de ces agents pathogènes au niveau des Légumineuses qui constituent les hôtes privilégiés de ce groupe de champignons.

3.3. EFFET DES FACTEURS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES SUR LE COMPORTEMENT in vitro DE L'A.pisi Lib.

Les résultats qui sont présentés dans ce chapitre concernent les exigences biologiques in vitro de l'un des agents responsables de l'antracnose du Pois. Ils constituent une première approche de la connaissance des principaux facteurs biotiques et abiotiques pouvant influencer le comportement de l'A. pisi.

3.3.1. INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE SUR LA CROISSANCE ET LA SPORULATION

Les résultats rapportés dans le tableau 9 et la figure 82, font apparaître des différences de comportement de quatre isolats d'A. pisi, en fonction des milieux étudiés.

Quels que soient les temps d'incubation, le maximum de croissance mycélienne est obtenu avec le milieu Malt (M.A.G.), tandis que les milieux P.D.A. et CZAPECK assurent la croissance la plus faible. Le milieu MATHUR montre un comportement intermédiaire, il se rapproche davantage du milieu Malt.

En ce qui concerne la sporulation, celle-ci est par contre meilleure sur le milieu MATHUR, alors que les milieux CZAPECK et P.D.A. se sont révélés beaucoup moins favorables à la sporulation. Le milieu Malt a donné une sporulation moindre, qui se rapprocherait plutôt de celle obtenue sur milieu MATHUR.

Enfin, tant pour la croissance mycélienne que pour la sporulation, de petites variations peuvent exister en fonction des isolats (cf. Fig. 82 et Tabl. 9).

3.3.2. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA CROISSANCE ET LA SPORULATION

Cette étude comparative a été effectuée pour quatre isolats, vis-à-vis d'une gamme de température allant de 0° à 40°C.

Les résultats obtenus (Fig. 83) montrent que, d'une façon générale, la croissance des isolats d' *A. pisii* augmente régulièrement de 0 à 20°C, ensuite elle diminue constamment pour devenir nulle à 40°C. L'optimum de croissance se situe donc à 20°C, alors que la température inférieure limite est d'environ 5°C et la température supérieure limite est de 30°C. Il faut noter que si pour cette espèce une température voisine de 40°C s'est avérée létale pour le champignon, par contre des températures inférieures à 5°C n'ont pas tué le champignon. D'ailleurs des tests d'analyse sanitaire, réalisés en plongeant au préalable les semences de Pois naturellement infectées par *A. pisii* dans de l'azote liquide, ont montré des taux élevés de contamination par ce champignon, après incubation.

En ce qui concerne l'action de la température sur la sporulation, les résultats du tableau 10, permettent de constater que les isolats du tableau 10, permettent de constater que les isolats étudiés ont une sporulation maximale à 22°C. L'optimum de sporulation est donc légèrement décalé par rapport à celui de la croissance mycélienne.

Tableau 9: Influence du milieu de culture sur la sporulation de l'Ascochyta pisi

Milieux Isolats	MALT	MATHUR	CZAPECK	P. D. A.
	M.A.G.			
A	+	++	n	n
B	+	++	n	n
C	++	+++	+	+
D	++	+++	+	+

Légendes: n : négligeable
 + : faible
 ++ : moyenne
 +++ : forte

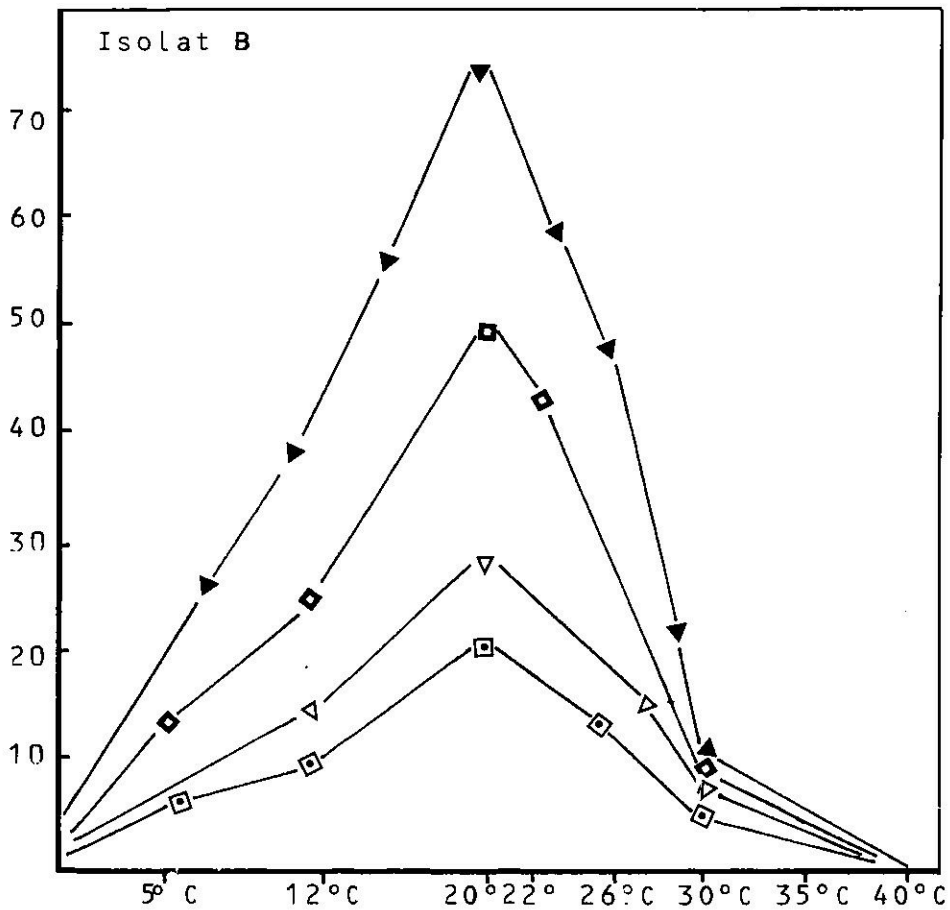
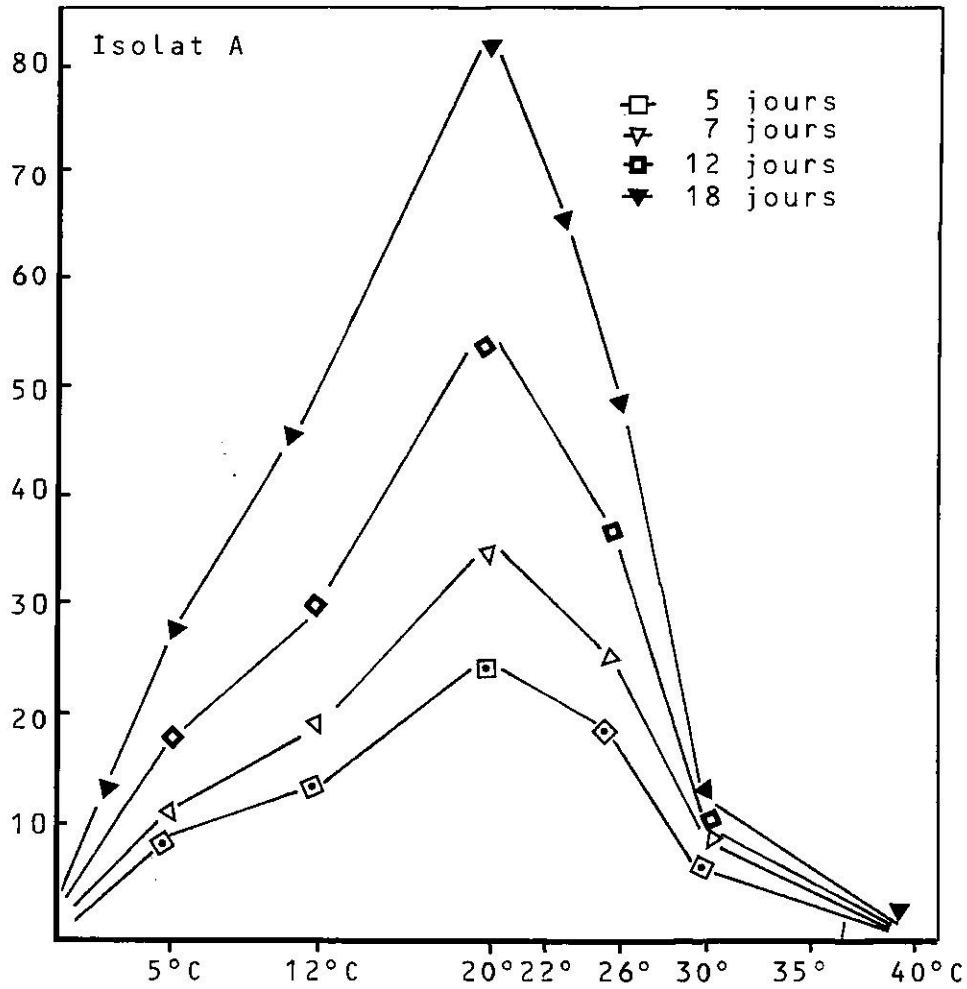
Tableau 10: Influence de la température sur la sporulation d'Ascochyta pisi

Isolats Températures	Isolat D	Isolat B
	5°	0
12°	+	+
20°	+++	++
22°	++++	+++
26°	++	+
30°	+	-
40°	0	0

Légende: 0: Sporulation nulle
 +: " très faible
 ++: " moyenne
 +++: " forte
 ++++: " très forte

Fig. 83: Influence de la température sur la croissance mycélienne d'*Ascochyta pisi* Lib. en mm.

Ø en mm



3.3.3. ACTION DE LA LUMIERE ET DE L'OBSCURITE SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE ET SUR LA SPORULATION

De nombreuses études (LEACH, 1962; BLACKEMAN et DICKINSON, 1967; BOMPEIX, 1974) ont montré que la croissance mycélienne et surtout la sporulation, peuvent être très influencées par l'absence ou la présence de lumière.

Les résultats obtenus dans notre expérimentation (tabl. 11) indiquent que les isolats d' *A. pisi* isolés à partir de Pois sont indifférents à la lumière pour leur aptitude à la sporulation; celle-ci était même légèrement favorisée par l'obscurité. En plus de la lumière et de l'obscurité, nous avons montré antérieurement (BOUZNAD, 1978) que l'action de trois types de filtres n'a eu aucun effet ni sur la croissance mycélienne, ni sur la sporulation.

Des expériences réalisés en collaboration avec MOHAMMEDI (1984) sur un plus grand nombre d'isolats, ont permis de distinguer des isolats qui sporulent plutôt mieux à la lumière (Tabl. 12). En ce qui concerne la croissance mycélienne, la plupart des isolats présentent une croissance légèrement favorisée par l'obscurité.

3.3.4. INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS SUR LA GERMINATION DES SPORES D'*A. pisi* Lib.

Les premiers stades de la germination des spores ont fait l'objet de très nombreux travaux (CLAYTON, 1942; COHRANE; 1958; ZARACOVITCH, 1966; MANNERS, 1966). Cependant, aucun travail du même ordre n'avait été réalisé sur *A. pisi*. Seuls BLACKEMAN (1968) puis HEATH et WOOD (1969)

Tableau 11: Influence de la lumière sur la croissance et sporulation de l'*Ascochyta pisi* Lib.

Temps d'incubation(jours)	CROISSANCE(1)		(2)	
	Lumière	Obscurité	Lumière	Obscurité
3	15	2	-	-
6	6	6,5	$3 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$
8	12	13	$3 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$
10	16	17	$5 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^5$
13	25	27	$7 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^5$
15	30	32,5	$15 \cdot 10^5$	$21 \cdot 10^5$

(1) croissance linéaire en mm

(2) sporulation en spores/ ml

Tableau 13: Influence de la lumière et obscurité sur la germination des spores d'*Ascochyta pisi* Lib en goutte pendante

Température d'incubation	Conditions d'éclairement	
	à la lumière	à l'obscurité
5°	3 %	5 %
12°	-	25 %
12°	97 %	98 %
30°	-	10 %

Tabl.12 Comparaison de la croissance et sporulation de différents isolats d'*Ascochyta pisi* après 11 j. d'incubation à l'obscurité et à la lumière (MOHAMMEDI, 1984).

A l'obscurité						
	Malt		Mathur		Czapeck	
	Croissance mycélienne	Sporulation	Croissance mycélienne	Sporulation	Croissance mycélienne	Sporulation
A. pisi (Collo)	10,12	6,6	22	314	18,25	55
A. pisi (AL ₂ N-4)	10,5	15,6	17,5	760	16,5	115,5
A. pisi EA ₂₃	18,5	22,2	14,5	211	10,62	44
A. pisi BS ₃	9,75	23	22,62	274	25,75	11

A la lumière						
	Malt		Mathur		Czapeck	
	Croissance mycélienne	Sporulation	Croissance mycélienne	Sporulation	Croissance mycélienne	sporulation
A. pisi (Collo)	12,12	204	21,75	593	10,37	13,3
A. pisi (AL ₂ N-4)	21,25	121	24,25	196	11,00	36,6
A. pisi EA ₂₃	10,62	140	17,87	633	13	13,3
A. pisi BS ₃	9,12	12	14,75	98,8	12,25	22,2

ont étudié *in vivo* l'effet de la concentration en spores de quelques espèces d'*Ascochyta* spp. sur le développement de la lésion. Mais ces auteurs n'ont à aucun moment abordé les conditions de germination *in vitro* des spores: température, humidité et lumière. Dans notre cas, sans la connaissance de tous ces paramètres, il n'aurait pas été possible de mener à bien l'étude des relations hôte-parasite ou celle du pouvoir pathogène des isolats. A cet effet, nous avons jugé utile de présenter l'essentiel des résultats déjà acquis dans une précédente étude (BOUZNAD, 1978), complétée par le présent travail:

Compte tenu des différentes définitions proposées par divers auteurs et de la spécificité des spores de l'*A. pisi*, l'appréciation de la germination a été notée selon les critères suivants:

- a été considérée comme germée, toute spore ayant subi un changement morphologique se traduisant par un début d'apparition d'un tube germinatif de 1,5 à 2 μm de longueur;

- dans un deuxième temps, l'allongement du tube germinatif intervenu au cours du temps d'incubation a été pris en considération.

La germination des spores d'*A. pisi* étant très influencée par les conditions expérimentales, l'action de certains facteurs (température et lumière) a été précisée par une série d'essais préliminaires. Auparavant, les techniques elles-mêmes (goutte pendante, lame gélosée et membrane cellophane) ont été testées afin de vérifier leur fiabilité. L'influence de la suspension de spores (concentration et volume de la goutte) a été également précisée.

- INFLUENCE DU SUPPORT SUR LA GERMINATION DES SPORES

La germination des spores et la croissance du tube germinatif sur lame gélosée sont de loin les meilleures. Cette technique permet une répartition homogène des conidies

à la surface de la lame, ce qui facilite la lecture et notamment la mesure de la longueur du tube germinatif. Par contre, avec la goutte pendante, une hétérogénéité dans la répartition des spores fait que leur majorité subit une décantation provoquant alors une inhibition de la germination.

Enfin, l'emploi d'un support en cellophane (membrane) a permis d'obtenir une germination nettement meilleure qu'en goutte pendante. Cependant, une légère hétérogénéité due au plissement inévitable du support peut être notée. Malgré cet inconvénient, cette technique peut être conseillée pour certaines études (coloration nucléaire).

- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SPORES ET DU VOLUME DE LA GOUTTE SUR LA GERMINATION

L'examen de l'ensemble des résultats exprimés par la figure 84 bis montre l'étroite relation qui existe entre la concentration en spores, le pourcentage de germination et la croissance du tube germinatif. Pour une concentration donnée, les limites du volume de la goutte doivent être déterminées. Ainsi, pour une concentration de 10^6 spores/ml, on remarque que lorsque le volume dépasse $10 \mu\text{l/goutte}$, les spores s'agglutinent, ce qui provoque une inhibition de la germination et rend les comptages difficiles. Par contre, au dessous de $10 \mu\text{l/goutte}$, il y a risque de dessèchement de la goutte, ce qui entraîne la non germination des spores. Dans de nombreux cas, la différence peut atteindre 50% par le simple fait de passer d'une concentration de 10^6 spores/ml à 10^4 spores/ml.

- INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA GERMINATION DES SPORES

Dans une précédente étude (BOUZNAD, 1978), nous avons montré qu'après 21h d'incubation et pour une gamme de température comprise entre 12 et 26°C, le pourcentage de

germination des spores était sensiblement le même (environ 90%). La précision de ce résultat étant insuffisante, nous avons repris ce travail en étudiant, au cours du temps (entre 6h et 21h d'incubation), la dynamique de la germination des spores de l'*A. pisi* à des températures comprises entre 5° et 30°C. Les notations ont été effectuées après 6, 9, 12, 18 et 21h d'incubation.

D'après les résultats obtenus dans la figure 84, on constate une nette différence de germination des spores en fonction des temps d'incubation et des températures étudiées. D'une manière générale, le taux de germination des spores est très réduit aux basses (5°C) et aux fortes températures (30°C), quelle que soit la période d'incubation. A ces températures extrêmes, il y a une inhibition importante du processus germinatif. Par contre, pour une large gamme de température (18 à 22°C) et pour une incubation supérieure à 12h, le taux de germination tend vers un palier.

Enfin, les différentes courbes de la figure 84, confirment que pour ce champignon, l'optimum de la germination se situe entre 20 et 22°C.

- ACTION DE LA LUMIERE SUR LA GERMINATION DES SPORES

Comme pour la croissance mycélienne du champignon déjà examinée, le facteur lumière ne semble pas être déterminant dans le processus germinatif des spores. Les résultats obtenus (cf. tabl. 13) ne présentent pas de grandes différences; il y aurait seulement une légère augmentation de la germination pour les essais menés à l'obscurité.

3.3.5. DESCRIPTION DU PROCESSUS GERMINATIF

L'étude *in vitro* et *in vivo* de la germination des pycnidiospores de l'*A. pisi* a permis de distinguer trois principales étapes dans le processus de germination des spores, la coloration nucléaire par la technique de GIEMSA a complété cette étude.

Fig. 84: Influence de la température et du temps d'incubation sur la germination *in vitro* des pycnidiospores d'*Ascochyta pisi*.

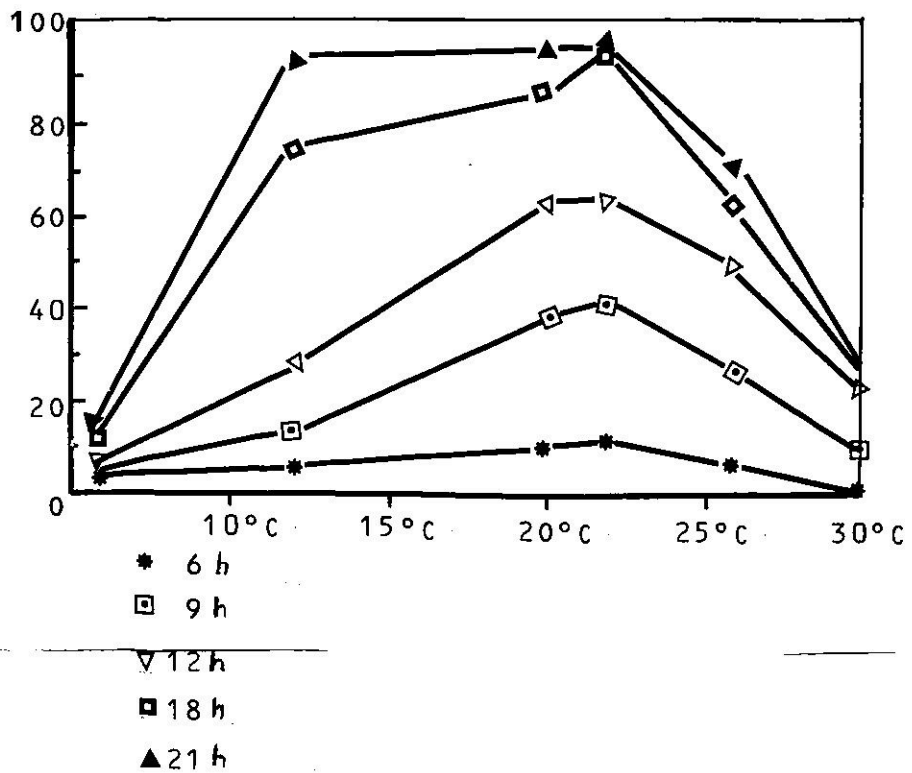
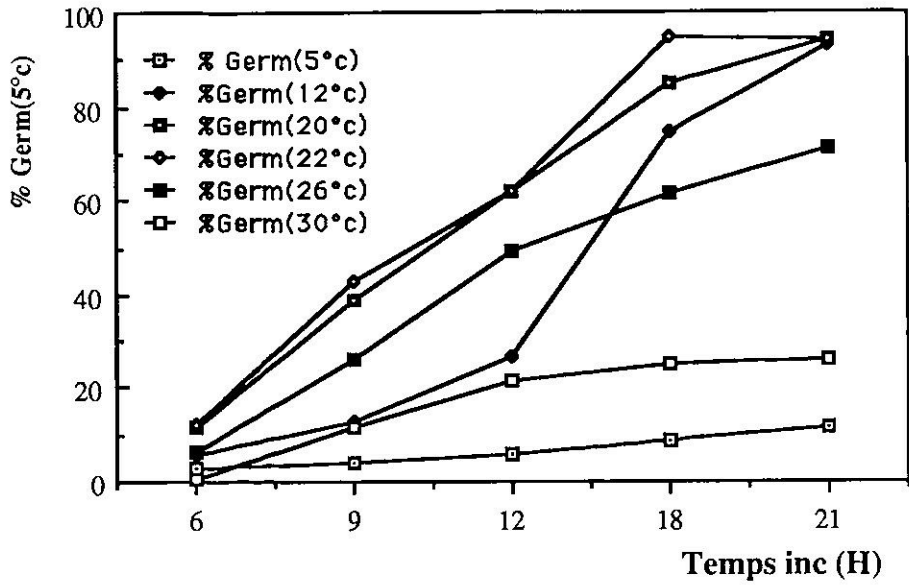
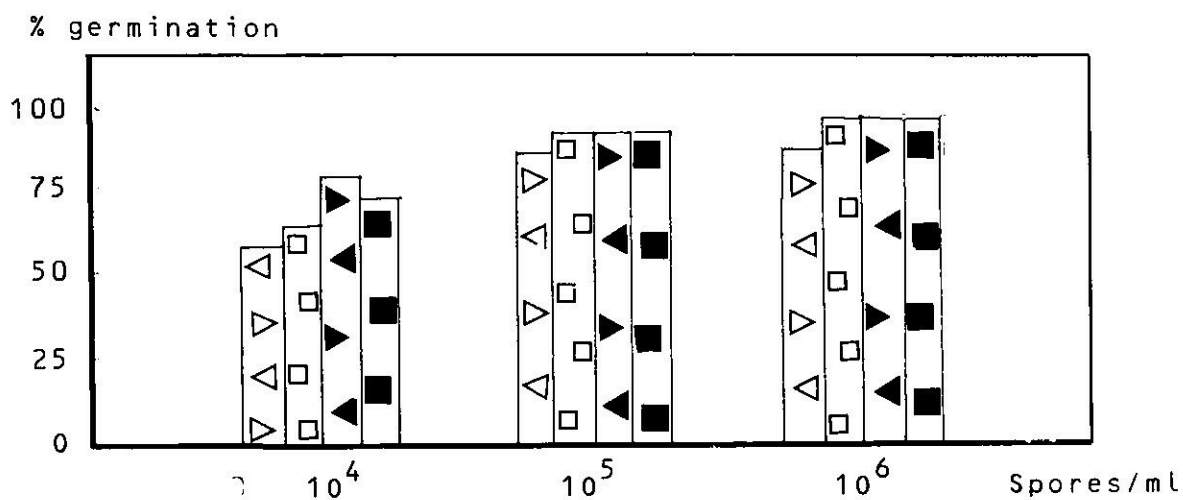
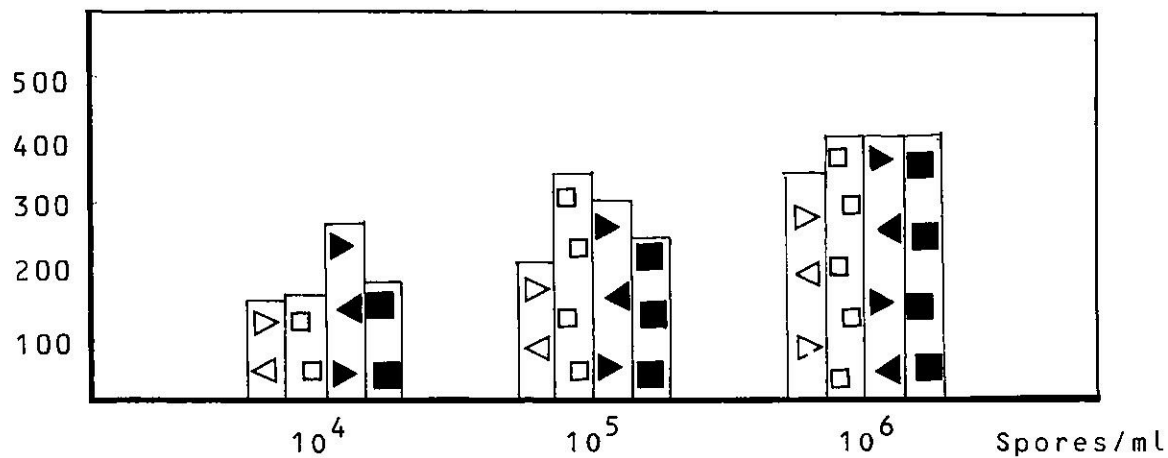


Fig.84 bis : Influence de la concentration en spores sur le taux de germination et de croissance pour 4 isolats d'*Ascochyta pisi* Lib. (incubation 22°C)



Croissance en μm



Légendes:

- | | |
|------------|------------|
| ▷ Isolat A | ▶ Isolat C |
| □ Isolat B | ■ Isolat D |

- PREMIERE PHASE

Par une absorption d'eau, les conidies augmentent de volume et subissent simultanément une constriction au niveau de la septation: c'est le premier signe de l'aptitude des conidies à germer. Au cours de cette phase de gonflement, il y aurait division du noyau (cf. figure 85).

- DEUXIEME PHASE

Après un temps plus ou moins long, les zones réfringentes apparaissent aux extrémités de la conidie, puis deux tubes germinatifs sont rapidement émis. Durant cette phase, on assiste à la migration de l'un des deux noyaux vers le tube germinatif (Fig. 85).

- TROISIEME PHASE

Cette étape est caractérisée par la croissance des tubes germinatifs. Initialement, dans la majorité des cas, l'un des deux tubes est toujours plus long que l'autre (Fig. 86), contrairement à l'*A. pinodes* dont la germination et la croissance semblent s'effectuer par une seule extrémité (Fig. 88). Cette croissance se poursuit indéfiniment jusqu'à l'enchevêtrement mycélien. Au fur et à mesure de son élongation, le tube germinatif subit des septations et selon le cas, on peut noter la présence d'un ou de deux noyaux par segment (Fig. 87).

3.3.6. DISCUSSION

L'étude du comportement *in vitro* de l'*A. pisi* a permis de comparer, dans un premier temps, la variation de la croissance mycélienne et celle de la sporulation en fonction de trois principaux facteurs: milieu de culture, température et présence ou absence de lumière.

Fig. 85 : Initiation de la germination des conidies (Co) d'*Ascochyta pisi* ; observation obtenue par la technique de cellophane. On distingue l'émission de tubes germinatifs (➤) et une division nucléaire (→). L'un des noyaux migrera vers le tube germinatif.

Fig. 86 : Après 9 à 12h d'incubation, chaque conidie bicellulaire a germé en donnant deux tubes germinatifs de longueur inégale et à l'extrémité desquels (➡) on note la présence d'un noyau (N). Dans le cas de conidies tricellulaires, chaque cellule émet un tube germinatif.

Fig. 87 : Stade ultérieur de la germination caractérisé par l'allongement des tubes germinatifs (➡), leur cloisonnement (▶) et une répartition inégale du nombre de noyaux par segment (→) ; en général 1 à 2.

Fig. 88 : Aspect de la germination des conidies d'*Ascochyta pinodes*. Comparativement à l'*Ascochyta pisi*, dans ce cas la germination est longtemps unipolaire, donnant lieu à la croissance d'un seul tube germinatif (➡) et cloisonnement de celui-ci (▶).

En ce qui concerne l'influence du milieu de culture, le milieu Mathur, mis au point initialement pour le *Colletotrichum Lindemuthianum* par Mathur et al., (1950), s'est nettement montré le plus favorable. Ceci a été confirmé par AMEZIANE (1979) pour l'*Ascochyta rabiei* et par MOHAMMEDI (1984) pour d'autres espèces d'*Ascochyta*: *A. fabae*, *A. viciae*, *A. lathyri* et *A. pinodes*.

Toutefois, selon les auteurs, d'autres milieux peuvent être couramment utilisés: le milieu P.D.A. est de loin le plus cité (BAJAN, 1968; SHERIDAN, 1981; SUSURI, 1986). Le milieu Malt à 2% a été surtout conseillé pour l'isolement du genre *Ascochyta* à partir de semences (CHAMPION, 1969; HEWETT, 1971; ANSELME et al., 1971, il a été utilisé aussi par BREWER (1960) et LEACH (1962) pour la culture *in vitro* du champignon. Le milieu CZAPECK, qui nous a donné une sporulation très médiocre, avait été déjà utilisé par SKADOW (1978).

Par rapport à un travail précédent (BOUZNAD, 1976), les milieux Mathur, Malt, P.D.A. et Czapeck, ne permettent pas d'obtenir une sporulation aussi abondante que celle obtenue avec le milieu préparé à partir de feuilles de Pois stérilisées. Malheureusement, d'un point de vue pratique, ce dernier milieu exige une disponibilité en matériel et un temps de préparation plus long, comparativement au milieu Mathur, par exemple.

En ce qui concerne les résultats obtenus sur l'effet de la température, son action s'est révélée, dans certaines limites, déterminante sur le comportement *in vitro* de l'*A. pisi*. D'une façon générale, la croissance mycélienne du champignon se caractérise par une courbe classique semblable à celle décrite pour la plupart des espèces fongiques (JOLY et al., 1964). Comparativement à d'autres travaux ayant porté

sur l'espèce *A. pisi*, on note une variation dans les exigences thermiques de ce champignon; dans certains cas les écarts pouvant être importants. Si avec une température optimale située à 20 - 22°C, nos résultats rejoignent ceux obtenus par SUSURI (1976), par contre, ils diffèrent de ceux de DOROZKIN et KREMNEVA (1976) indiquant un optimum situé entre 15 et 20°C. D'autres auteurs (SORGEL, 1956; BERTINI, 1957 in SUSURI, 1976) ont donné respectivement 23°C et 26°C comme température optimale de croissance pour leurs isolats étudiés.

Ces variations très marquées des températures optimales de croissance et de sporulation de l'*A. pisi*, suggèrent que ces exigences thermiques pourraient être liées à des biotypes définis par les conditions géographiques. PARBERY (1981) a décrit, pour des espèces de *Colletotrichum* spp., des isolats de régions tempérées et des isolats de régions subtropicales dont les températures optimales de germination des spores diffèrent.

D'après nos résultats et les données bibliographiques, nous pouvons considérer que l'*A. pisi* possède des biotypes variables d'une région géographique à une autre. Ceci montre l'intérêt préalable de définir les exigences biologiques de nos isolats d'*A. pisi* qui conditionnent nos travaux sur les relations hôte-parasite.

Comme dernier facteur abiotique abordé dans cette étude, l'action de la lumière sur le comportement de ce champignon a été précisée. Contrairement à certaines espèces très exigeantes en lumière pour leur sporulation (COCHRANE, 1958; BLACKEMAN, 1968; BOMPEIX, 1974), tous les résultats obtenus sur *A. pisi* (BOUZNAD, 1978; BOUZNAD et MOHAMMEDI, 1987) indiquent qu'il peut croître et sporuler indifféremment

en présence ou en absence de lumière. Pour nous en assurer d'une obscurité totale, nous avons pris soins d'utiliser comme témoin, l'*Epicoccum nigrum*, connu pour ses exigences en lumière (BOMPEIX, 1974). Dans les mêmes conditions expérimentales, ce champignon a montré une forte sporulation à la lumière et une absence de celle-ci à l'obscurité.

Dans le cas de l'*A. pisi*, l'intensité de cette sporulation, et à moindre degré la croissance mycélienne, peuvent être modifiées dans des proportions variables par ce facteur. Selon la nature du milieu de culture, des différences de sporulation existent d'un isolat à l'autre. Ce type de comportement expliquerait les résultats obtenus par LEACH (1962) sur des isolats d'*A. pisi* isolés à partir de *Vicia villosa*.

Le deuxième aspect abordé dans ce présent travail a permis de caractériser *in vitro*, les divers facteurs contrôlant la germination des spores ainsi que la croissance du tube germinatif.

Les résultats obtenus ont montré comme pour la croissance mycélienne, l'influence de la température, mais ils ont aussi permis de préciser quels sont les autres facteurs pouvant modifier la germination des spores indépendamment du facteur essentiel, la température. Il a été notamment établi que la nature du support (taille de la goutte pendante, lame gélosée, cellophane) et la concentration des spores peuvent, dans une certaine mesure, influencer la germination.

Enfin, au cours de cette étude, les changements morphologiques et caryologiques intervenant durant le processus germinatif des spores ont été précisés, définissant ainsi les différentes étapes de la germination.

3.4. POUVOIR PATHOGENE DE L' *A. pisi* SUR LES LEGUMINEUSES ET FACTEURS DE TRANSMISSION PAR LA GRAINE

La caractérisation morphologique basée uniquement sur les organes de reproduction du champignon s'est avérée insuffisante pour une identification rigoureuse des espèces d'*Ascochyta* spp. Pour certaines de ces espèces cette difficulté est rendue plus grande du fait qu'il s'agit d'un groupe de pathogènes s'attaquant à une gamme d'hôtes botaniquement très proches. L'étude de la spécialisation parasitaire, telle que nous l'avons abordée dans le présent travail, a donc pour but de préciser, d'une part, le degré de compatibilité qui existe entre les espèces hôtes de Légumineuses et les espèces d'*Ascochyta* ssp. précédemment inventoriées et, d'autre part, la variation du pouvoir pathogène de l'espèce *A. pisi* à l'égard du Pois.

3.4.1. PATHOGENECITE DE L'*Ascochyta pisi* A L'EGARD DES LEGUMINEUSES

L'aptitude de l'*A. pisi* à attaquer les Légumineuses a été testée en serre par une série d'inoculations artificielles pratiquées sur graines et sur plantules. Les principaux résultats obtenus sont résumés dans le tableau 15.

La réponse à ces différentes inoculations permet de mettre en évidence la nette spécificité de l'*A. pisi* pour son hôte, le Pois, *Pisum sativum*. Nous avons néanmoins relevé quelques nécroses apicales sur Pois chiche, mais elles restent atypiques de l'antracnose.

Tableau 15: RESULTATS DES INOCULATIONS ARTIFICIELLES SUR PLANTULES ET GRAINES DE PLUSIEURS ESPECES LEGUMINEUSES AVEC DE L'*Ascochyta pisi* Lib.

PLANTES HOTES	INOCULATION DES GRAINES	INOCULATION DES PLANTULES
<i>Pisum sativum</i>	XX	XXX
<i>Vicia sativa</i>	0	0
<i>Lens culinaris</i>	0	0
<i>Vicia faba</i>	0	0
<i>Lathyrus ochrus</i>	0	0
<i>Phaseolus vulgaris</i>	0	0
<i>Cicer arictinum</i>	0	Atypique

LEGENDES:
XXX: Très fortes attaques
XX: Attaques
0: Pas d'attaques

3.4.2. COMPATIBILITE ET INCOMPATIBILITE DU POIS
(*Pisum sativum*) A L'EGARD DES AUTRES
ESPECES D'*Ascochyta* spp.

Comme précédemment, des inoculations artificielles réalisées sur le Pois à l'aide des principales espèces d'*Ascochyta* spp. ont montré une incompatibilité totale de cet hôte avec les espèces: *A. rabiei*, *A. lentis* et *A. viciae*. Par contre, les plantules de Pois ont été attaquées

normalement par les espèces habituelles: *A. pisi*, *A. pinodes* et *A. pinodella*. Enfin, nous avons obtenu un comportement douteux (symptômes atypiques) sur les plantules contaminées par *A. fabae*, *A. lathyri* et *A. phaseolorum*.

Tableau 16 : RESULTATS DES INOCULATIONS ARTIFICIELLES REALISEES SUR PLANTULES ET GRAINES DE POIS (*P. sativum*) AVEC PLUSIEURS ESPECES D'*Ascochyta*

PATHOGENES	INOCULATION SUR PLANTULES	INOCULATION SUR GRAINES
<i>A. pisi</i>	XXX	XX
<i>A. pinodes</i>	XX	X
<i>A. pinodella</i>	X	X
<i>A. viciae</i>	0	0
<i>A. lentis</i>	0	0
<i>A. fabae</i>	X(atypique)	0
<i>A. rabiei</i>	0	0
<i>A. lathyri</i>	X(atypique)	0
<i>A. phaseolorum</i>	X	XX(Cotylédon)

LEGENDES: XXX: très fortes attaques
 XX:attaques
 X: faibles attaques
 0: pas d'attaque

Au cours de ces inoculations artificielles (Tabl.16) le Pois (*Pisum sativum*) s'est montré hautement compatible avec les pathogènes spécifiques habituels: *A. pisi*, *A. pinodes* et *A. pinodella*. Par contre, les autres espèces d'*Ascochyta* sont, soit totalement incompatibles: *A. viciae*, *A. lentis* et *A. rabiei*, soit incapables de produire autre chose que des symptômes atypiques.

3.4.3. VARIABILITE DU POUVOIR PATHOGENE
DES ISOLATS D'*Ascochyta pisi* Lib.

Lors de précédents résultats obtenus dans notre laboratoire (BOUZNAD, 1978; LOUNIS, 1982 et MOHAMMEDI, 1984), une variation du pouvoir pathogène des isolats entretenus et conservés dans notre collection a été notée.

De plus, les travaux de WALLEN (1958), d'HUBBELLING (1982, 1984) et de COUSIN (1982, 1984) ont établi l'existence de races physiologiques chez ce champignon. A l'aide de la même gamme d'hôtes différentiels que celle utilisée par ces auteurs, nous avons entrepris l'identification des pathotypes existant en Algérie. A titre comparatif, quelques isolats provenant de diverses régions de France ont été retenus dans notre essai.

Les notations individuelles effectuées sur chaque plantule (selon les modalités indiquées au paragraphe 2.6.5.), ont permis de caractériser, par une valeur moyenne, la réaction globale de chacun des 10 cultivars hôtes à l'égard des 11 isolats testés. L'ensemble des résultats présenté dans le tableau met en évidence une grande variation des indices d'attaque suivant les couples hôte/pathogène considérés. C'est ainsi que par exemple les cultivars: "Finale", "Rondo" et "Gullivert " ont manifesté une forte résistance avec les isolats: *A. pisi* (Tezier), *A. pisi* (MOU) et *A. pisi* (GIR). Par contre, les mêmes cultivars ont été fortement attaqués par *A. pisi* (L/G).

L'analyse détaillée des indices d'attaques obtenus (tabl.17), permet de constater très nettement que le classement des cultivars diffère d'un isolat à

Tableau 17 : RESULTATS DES INOCULATIONS PAR LES ISOLATS D'A. pilsü
SUR LES HOTES DIFFERENTIELS

Variétés hôtes	Isolats										
	A.pilsü (Tezier) (B.S.)	A.pilsü (MOU.)	A.pilsü (EK ₂)	A.pilsü (GIR.) (AL ₂ N°4)	A.pilsü (Collo)	A.pilsü (DP ₁₂)	A.pilsü (EA ₂₃)	A.pilsü (10908)	A.pilsü (L/G)		
ARABAL	2,45	4,43	4,5	3,75	4,21	3,37	3,5	3,71	3,05	2,95	4,5*
COBRI	3,12	3,83	4,22	3,70	3,62	2,95	3,14	3,27	4,05	2,56	3,5
DARK SKIN PERFECT (D.S.P)	2,37	4,25	3,97	2,80	3,15	3,16	3,68	3,20	3,36	3,57	3,76
FINALE	0,16	0,41	0,36	0,5	0,60	0,55	0,39	0,66	0,5	0,20	2,16
GULLIVERT	1,85	0,42	1,10	1,13	1,0	3,78	3,0	2,42	3,65	3,45	2,91
MERVEILLE KEL.	3,45	3,85	4,15	3,21	3,5	4,50	4,07	4,3	4,13	4,5	4,07
RONDO	0,23	0,39	0,62	0,61	0,95	0,45	0,15	0,81	0,71	0,36	3,45
STARCOVERT	1,10	4,35	3,67	4,20	4,33	3,44	2,90	2,45	2,65	2,16	2,64
SUPCOVERT	2,75	4,25	4,31	3,83	3,87	2,67	2,25	1,31	1,27	3,12	-
VITALIS	2,35	4,65	4	4,25	4,12	2,27	3,0	3,75	3,12	3,06	3,0

* degré d'attaque selon l'échelle de 0 à 5

L'autre. D'autre part, si à l'aide de certains cultivars, il est possible de toujours classer les isolats dans le même ordre (Fig.89), cela n'est pas le cas pour d'autres. Ce dernier comportement peut être illustré par le cultivar "Gullivert" en comparaison avec le cultivar "Darkskin Perfect", où les isolats ont un arrangement totalement différent.

Les deux types d'arrangement établis selon que l'on considère l'hôte (Fig.89) ou le pathogène (Fig.90), mettent en évidence la présence de différents gènes de résistance au niveau des cultivars et la présence de différents gènes de virulence au niveau des isolats.

Ces différences de comportement très importantes ne peuvent s'expliquer, d'après VAN DER PLANK (1968), que par l'existence de races physiologiques.

Pour l'identification des pathotypes d'*A. pisii*, les auteurs ont employé deux principales appellations (tabl. 18), soit une désignation par des chiffres romains: race I, race II, race III et race IV (WALLEN, 1958), soit une désignation par des lettres alphabétiques: race A, race B, race C, race D et race E (COUSIN, 1972; HUBBELING, 1972).

Dans notre cas, pour établir une comparaison avec ces races, les résultats exprimés par un coefficient de sensibilité (Tableau 17), ont été présentés autrement (Tabl. 19). Il a été considéré comme sensible (exprimé par S) toute les fois que l'interaction hôte/pathogène a un coefficient supérieur à deux (> 2), et comme résistant (exprimé par R), lorsque le coefficient est inférieur à deux (< 2). Ce type de notation permet de recenser la présence de trois groupes de pathotypes bien distincts, parmi les 11 isolats étudiés.

Fig. 90: Classement des cultivars de Pois selon leur niveau de réaction à l'égard des isolats d'*Ascochyta pisi*.

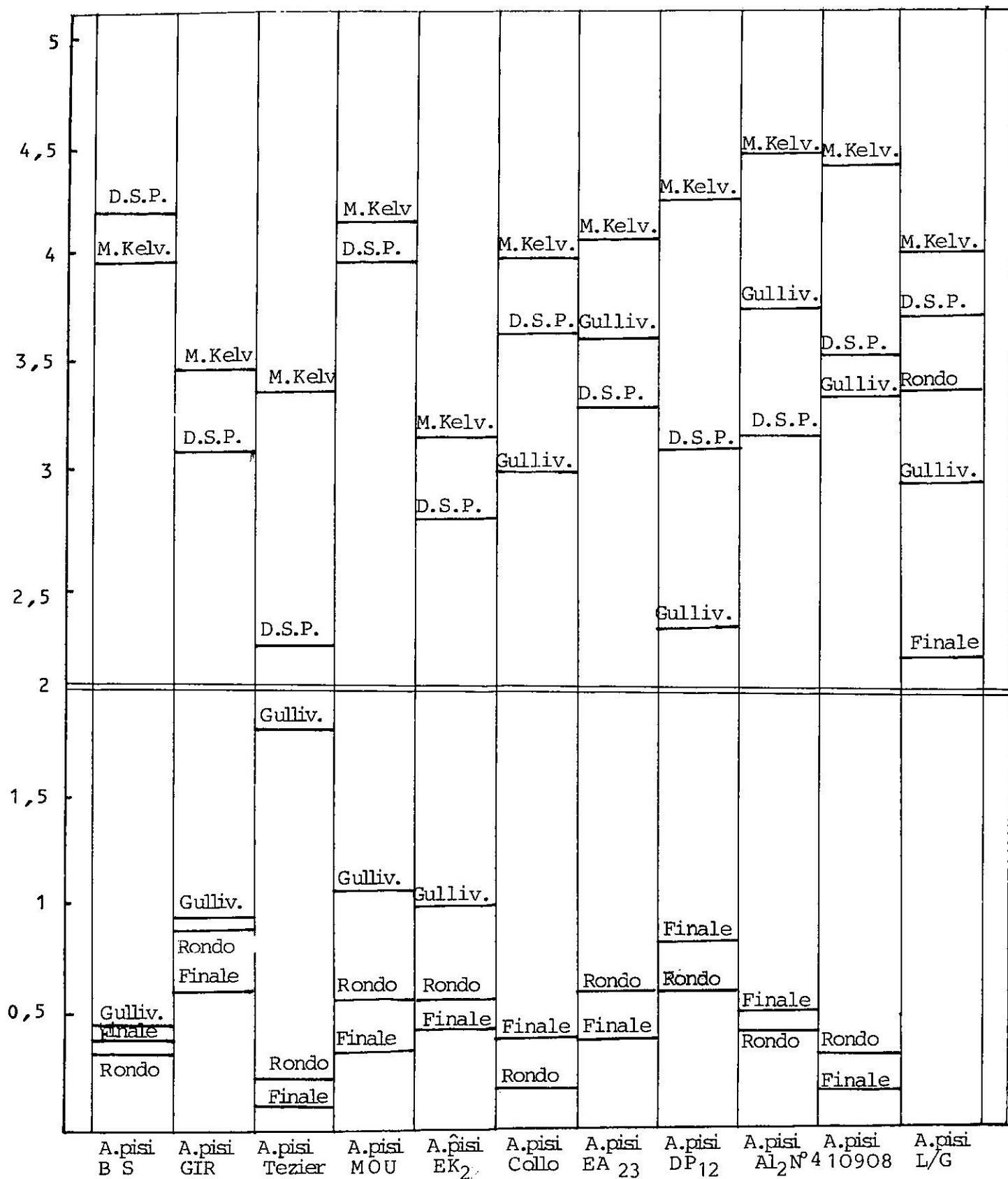


Tableau 18 : TYPE DE REACTION DES CULTIVARS DIFFERENTIELS DE POIS ET IDENTIFICATION DES RACES PHYSIOLOGIQUES D'A. pisu DETECTEES AU CANADA, EN FRANCE ET EN HOLLANDE (WALLEN, 1957; COUSIN ET HUBBELING, 1972 , 1984)

	France-Hollande				
Canada (WALLEN, 1957)	Race I	Race II	Race III	Race IV	
	(COUSIN et HUBBEKING, 1972, 1983)				
	Race B	Race C	Race D	Race E	
Kelvedon Wonder	R	R	S	R	R
Profusion	R	R	R	R	S
Arthur	R	R	S	S	S
Valley Smalton	R	S	S	S	S
Stirling, Venlona II	R	R	R	R	-
Gullivert	-	R	S	R	R
Finale	R	-	R	R	-
Starcoverte vitalis supcoverte	-	S	S	S	S
Rondo	R	R	R	R	S
Engress	S	S	S	S	-

Tableau 19 : TYPES DE REACTION DES CULTIVARS DIFFERENTIELS
A L'EGARD DES ISOLATS D'A. pisi ETUDIES

Isolats	A.pisi	A.pisi	A.pisi	A.pisi	A.pisi	A.pisi	A.pisi	A.pisi	A.pisi	A.pisi	A.pisi	A.pisi	A.pisi
Variétés hôtes	(B.S.)	(Mou.)	(EK ₂)	(GIR)	(AL ₂ N°4)	(Collo)	(DP ₁₂)	(EA ₂₃)	(10908)	(L/G)			
GUILLIVERT	R	R	R	R	S	S	H.S.	S	S	S	S	S	S
RONDO	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
FINALE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
MERVELLE DE KELVEDON	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
DARK SKIN PERFECT(D.S.P.)	H.S.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ARABAL	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
STRARCOVERT	R	S	S	S	S	S	H.S.	S	H.S.	S	H.S.	S	S
SUPCOVERT	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
VITALIS	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
COBRI	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R = Résistant
S = Sensible
HS = Hautement sensible

- Ont un comportement identique, les isolats A. pisi (Collo), A. pisi (EA 23), A. pisi (AL₂ N⁰4) et A. pisi (10908). D'après le tableau 19, ces isolats s'identifient à la race C ou race III.

- Ont un comportement intermédiaire entre la race C et la race D, les isolats A. pisi (GIR), A. pisi (BS), A. pisi (MOU), A. pisi (Tezier) et A. pisi (EK₂). Ils diffèrent de la race C, car ils sont dépourvus du gène de virulence sur le cultivar "Gullivert" et diffèrent de la race D, par leur agressivité élevée sur "Merveille de Kelvedon".

-Efin A. pisi (L/G) doit être génétiquement différent des isolats précédemment décrits; tous les cultivars sans exception, sont attaqués. Il s'agit là d'une race considérée pour nous comme totalement nouvelle, de par sa virulence élevée à l'égard des cultivars les plus résistants. COUSIN et ALLARD qui ont suivi de près nos travaux ont été surpris par le comportement particulièrement pathogène de ce dernier isolat.

3.4.4. FACTEURS INFLUENÇANT LA TRANSMISSION DE L'Ascochyta pisi Lib PAR LA GRAINE

En culture de plein champ, l'extension de l'antracnose du Pois causée par A. pisi est le plus fréquemment assurée par l'utilisation de semences contaminées. Contrairement aux maladies systémiques, la transmission du pathogène par la graine a lieu durant la germination par contamination externe de l'épicotyle et à partir des feuilles cotylédonnaires. Ainsi, le moment du passage du champignon, de la graine enterrée aux parties aériennes

de la plante, constitue une étape déterminante pour la manifestation ultérieure de la maladie. La progression verticale de l'attaque est ensuite favorisée par les conditions climatiques de l'année.

Les résultats que nous présentons ci-dessous montrent comment la température, l'humidité, la plante hôte et la virulence du pathogène lui-même, influencent le passage de l'*Ascochyta pisi*, de la graine à la plantule.

3.4.5.1. EFFET DE LA TEMPERATURE ET DE L'IMBIBITION SUR LA TRANSMISSION DE L'*Ascochyta pisi* PAR LA GRAINE

Afin de mieux comprendre la dynamique de transmission de ce pathogène, nous avons étudié, dans un premier temps, l'action simultanée de la température et de l'imbibition sur la levée des plantules. L'examen du tableau 20 et de la figure 91, permet de constater que la levée est fortement influencée par la température d'incubation, ainsi que par l'imbibition préalable des graines. La vitesse de levée des plantules est d'autant plus faible que les températures d'incubation sont plus basses. Par contre, dans les mêmes conditions expérimentales, nous constatons qu'une imbibition préalable des graines permet d'obtenir une levée plus rapide des plantules par rapport aux graines non imbibées, et ceci quelle que soit la température considérée.

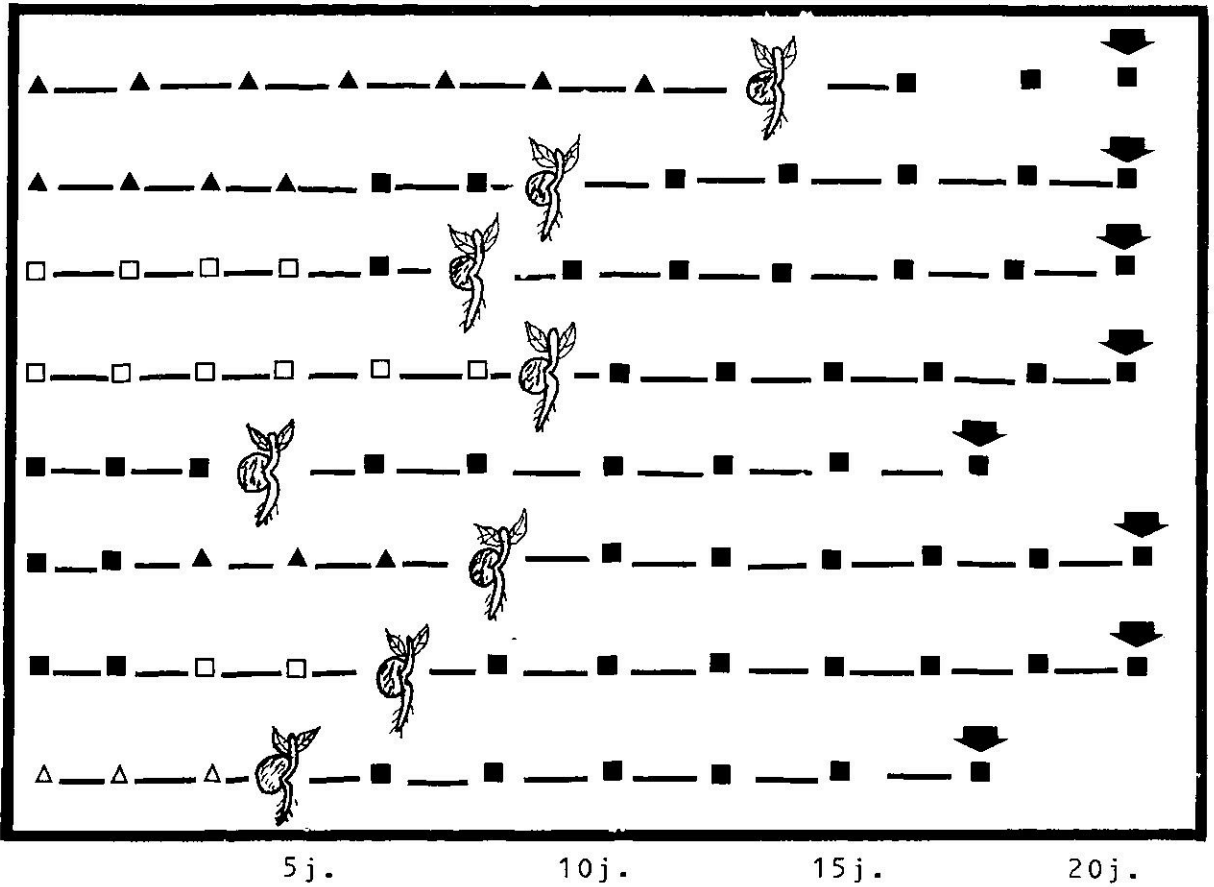
Dans un deuxième temps, nous avons étudié la transmission proprement dite, en réalisant la même expérimentation, mais cette fois-ci en inoculant les graines avant le semis.

Les résultats rapportés dans le tableau 20 montrent une variation de la transmission de l'A. pisi en étroite liaison avec les conditions d'incubation des graines comme cela est indiqué dans la figure 91. Pour une température d'incubation donnée, on constate qu'il y a toujours une forte réduction du nombre de plants atteints lorsque les graines ont subi au préalable une imbibition. La plus grande différence a été obtenue lorsque les graines contaminées ont été incubées d'abord à 12°C puis transportées à 22°C après la levée. Dans ces conditions précises les graines non imbibées ont donné 73% de plants avec la maladie, alors que pour les graines imbibées, le pourcentage de plants atteints n'était que de 23%. L'imbibition réduit donc très sensiblement la transmission du champignon, et dans certains cas cette réduction peut dépasser les 50% par rapport aux graines non imbibées.

Sur le plan manifestation de la maladie, une notation complémentaire effectuée sur les cotylédons après leur déterrement, a montré que ce sont les lots ayant eu le moins d'attaque sur les parties aériennes des plantules, qui avaient manifesté le moins de nécroses et de mycélium sur les cotylédons. De plus, comparativement aux témoins dont les téguments sont restés sains et de couleur plus ou moins verte, les graines infectées présentent une coloration rouge brique des cotylédons; la graine est recouverte partiellement ou totalement par du mycélium.

Comme pour l'imbibition, l'examen du tableau 20 met en évidence le rôle important joué par la température. La transmission de l'A. pisi par les graines est d'autant plus importante que les températures sont plus basses; cette différence est accentuée pour les lots ayant subi une imbibition avant leur inoculation. Ainsi, il y a une forte réduction de la maladie pour les graines incubées

Fig. 91: Protocole expérimental réalisé pour la transmission par la graine de l'*Ascochyta pisi* Lib. : variation de la levée en fonction des températures d'incubation



Légendes



- ▲ 5°C
- 22°C
- 12°C
- △ 30°C
-  levée
-  lecture

Tableau 20 :

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE L'IMBIBITION
SUR LA TRANSMISSION D'*Ascochyta blight* PAR LES GRAINES

Conditions Température	Graines imbibées		Graines non imbibées	
	% Levées	% Contamination	% Levées	% Contamination
30°C	97	3	96	0
22°C	100	11	96	17
22°C	100	22	91	27
22°C	100	28	88	72
12°C	100	17	94	38
12°C	100	28	91	73
5°C	91	85	78	100
5°C	88	53	97	67

* temps et conditions d'incubation sont présentés dans la figure 91

à 30°C, alors que pour les lots incubés à des températures nettement inférieures, la transmission peut atteindre les 100% (cas des graines incubées à 5°C et n'ayant pas été imbibées au préalable).

3.4.3.2. INFLUENCE DE LA RESISTANCE VARIETALE
DE POIS ET DE LA PATHOGENICITE DES
ISOLATS D'*Ascochyta pisi* Lib., SUR
LA TRANSMISSION PAR LA GRAINE

Les recherches effectuées sur les conditions de la transmission de l'antracnose du Pois par les semences ont permis de répondre à deux questions importantes:

- La transmission de la maladie par la graine est-elle modifiée par la nature de l'hôte (résistance variétale)?
- Tous les isolats ou races ont-ils les mêmes degrés de transmission par la graine ?

A cet effet, une inoculation des graines de variétés de Pois ayant montré des niveaux de résistance très différents a été réalisée par un certain nombre d'isolats ou de race d' *A. pisi*.

Les résultats présentés dans le tableau 21 permettent de constater que la transmission du pathogène est grandement influencée par le niveau de résistance de la plante-hôte. Comparativement aux cultivars très sensibles ("Frisson" et "Amino"), le cultivar "Finale" (Considéré comme hautement résistant) a manifesté un faible pourcentage de passage du champignon au niveau des parties aériennes.

Tabl. 21: , Transmission de différents isolats
d'*Ascochyta pisi* sur trois cultivars de Pois
(Frisson, Amino et Finale).

Isolats	Cultivars	Frisson		Amino		Finale	
		%levées	%infectées	%levées	%infectées	%levées	%infectées
A. pisi	(Collo)	100	15	95	10	85	5
A. pisi	(EA ₂₃)	90	10	100	15	90	0
A. pisi	(EK ₂)	95	15	100	25	75	0
A. pisi	(DP ₁₂)	100	10	100	15	85	0
A. pisi	(MOU)	85	5	95	10	90	5
A. pisi	(BS)	90	25	100	20	90	5
A. pisi	(Tezier)	95	5	100	5	85	0
A. pisi	(Al ₂ N°4)	100	10	100	20	85	5
A. pisi	(L/G)	90	25	100	30	90	10
A. pisi	(GIR)	100	10	95	5	90	5
A. pisi	(10908)	95	35	100	40	85	0

De même, il semble y avoir une certaine corrélation entre la virulence des isolats tels que *A. pisi* (L/G) et *A. pisi* (B.S.) et l'importance de la transmission. Mais, le plus fort pourcentage d'attaque a été obtenu sur le cultivar "Amino" inoculé par *A. pisi* (10908), cultivar à partir duquel l'isolat avait été initialement isolé.

Par contre, l'isolat *A. pisi* (Tezier), le moins pathogène de toutes les souches étudiées, a présenté le plus faible degré de transmission.

3.4.5. DISCUSSION

En étudiant le pouvoir pathogène et la spécialisation parasitaire des espèces d'Ascochyta, nous avons montré, au niveau des Légumineuses, la présence de deux groupes d'espèces pathogènes. D'une part; des espèces très polyphages comme *A. pinodes* et *A. pinodella* (= *Phoma medicaginis* var. *pinodella*). D'autre part, des espèces d'Ascochyta se caractérisant par un degré de spécificité très élevé vis-à-vis de leurs hôtes (*A. pisi*, *A. fabae*, *A. rabiei* et *A. viciae*). Les deux premières espèces inféodées habituellement aux cultures de Pois ont été isolées à partir de la plupart des autres Légumineuses: *Vicia faba*, *Vicia sativa*, *Cicer orietinum*, *Lathyrus* sp. et *Phaseolus vulgaris*. Elles sont signalées par beaucoup d'auteurs sur cette famille de plantes cultivées (SPRAGUE, 1929; GROVES, 1967; PUNITHALINGAM et HOLLIDAY, 1972 et 1976; RICHARDSON, 1979 et 1983; SUTTON, 1980). Contrairement à ce qui est généralement rapporté par certains auteurs (SPRAGUE, 1929; LEACH, 1962), dans le deuxième groupe, les deux espèces *A. pisi* et *A. viciae* très souvent confondues, se sont montrées, dans notre étude, hautement

spécifique de leur hôtes respectifs: *Pisum* et *Vicia sativa*. De plus, la caractérisation morphologique et culturelle que nous avons déjà présentée, permet de considérer ces deux espèces fongiques comme étant bien distinctes.

Ces résultats rejoignent les descriptions faites par ONDREJ (1968) qui a identifié plusieurs espèces d'*Ascochyta* (*A. viciae*, *A. Viciae-villosa*, *A. punctata*, *A. onobrychidis* et *A. nicotyanthidicola*), isolées à partir de différentes Vesces.

En ce qui concerne cette même catégorie d'espèces hautement spécifiques, nous confirmons les résultats obtenus par certains auteurs, notamment pour *A. lentis* (GOSSEN et al., 1986 ; KAISER et HANNAN, 1986), *A. rabiei* (KAISER, 1973; AMEZIANE, 1979) et *A. fabae* (BEAUMONT, 1950; PUNITHALINGAM et HOLLIDAY, 1975), qui ne passent que sur leurs hôtes respectifs.

En ce qui concerne le cas particulier de l'*A. pisi*, l'étude approfondie du pouvoir pathogène de cette espèce à l'égard des principales Légumineuses (inoculation artificielle des graines et des plantules) confirme la spécificité de cette espèce. En dehors du Pois, *A. pisi* n'a montré aucun pouvoir pathogène à l'égard des espèces de Légumineuses considérées comme plantes hôtes par SPRAGUE (1929), PUNITHALINGAM et HOLLIDAY (1972) et SUTTON (1980) telles que *Vicia faba* et *V. sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Lathyrus ochrus* et *L. tingitanus*. Il faut noter encore que le comportement polyphage de cette même espèce, rapporté par BUCHANAN (1987),

sur les diverses Légumineuses n'a pas été confirmé. De même les inoculations artificielles avec *A. viciae*, *A. lentis*, *A. fabae* et *A. rabiei* n'ont pas entraîné d'attaque sur *Pisum sativum*.

En conclusion de cette étude, nous constatons la difficulté d'établir une systématique des *Ascochyta* spp. au niveau des Légumineuses. Si pour certaines espèces, l'hôte peut constituer à lui seul un critère fondamental pour l'identification de l'espèce pathogène, pour d'autres espèces, il est nécessaire de prendre en considération aussi bien les caractères morphologiques et culturaux du champignon, que la spécificité parasitaire.

Les recherches entreprises pour caractériser la variabilité génétique du pouvoir pathogène de l'*A. pisi*, ont permis d'une part, d'identifier en Algérie la présence de différentes races ou pathotypes et, d'autre part, de les comparer à ceux existant en France. A l'aide de la gamme d'hôte différentielle standardisée et préconisée par COUSIN et HUBBELING (1972, 1984) pour la détection des races physiologiques de ce pathogène, il a été possible de regrouper les isolats testés en trois races principales. A la race C ou race III, nous rattachons les isolats *A. pisi* (EA₂₃, Collo, AL₂ N₄, (10908 et DP₁₂). Plusieurs auteurs (LEWIS et MATTHEWS, 1986; DARBY et al., 1986) considèrent cette race comme étant la plus agressive et la plus répandue en Europe. Une nouvelle race voisine de C et de la race IV est représentée par les isolats *A. pisi* (GIR. BS, MOU, EK₂ et TEZIER). Enfin, l'isolat, *A. pisi* (L/G) s'est révélé particulièrement virulent même sur les cultivars "Rondo" et "Finale", habituellement reconnus

comme résistants. Ce dernier pathotype qui paraît assez nouveau à notre avis, a une virulence qui diffère de toutes les races identifiées jusqu'à présent en France par COUSIN (1972, 1984) et ALLARD (Communication personnelle). Cet isolat pourrait correspondre à la race 5 ou 6 décrite en Pologne par WECZYCKA (1984). Quant aux deux premières races prédominantes, de nombreuses similitudes ont été établies entre celles isolées en Algérie et en France; certaines ne diffèrent entre elles que par leur niveau d'agressivité. Il n'est pas exclu que ces différences n'aient pas une origine génétique. On peut faire l'hypothèse de la présence au sein de ces races de biotypes différents (ALI et al., 1976; WEGREZYCKA, 1984). D'autres exemples illustrant ce type de variation du pouvoir pathogène des Ascochyta en général, nous sont donnés par les travaux de VIR et GREWAL (1974) ainsi que par ceux de REDDY et SINGH (1983) concernant *A. rabiei*, agent responsable de l'antracnose du Pois Chiche.

Enfin, en mettant en évidence la grande variabilité du pouvoir pathogène de l'*A. pisii* (races physiologiques, biotypes) et les limites qui caractérisent la résistance génétique des Pois actuellement cultivables, nous montrons la difficulté accrue pour établir un programme d'amélioration génétique à l'égard de tous les gènes de virulence de l'*A. pisii*. Dans notre cas précis, parmi tout le matériel végétal testé, aucun cultivar n'a montré une résistance totale à l'égard des pathotypes étudiés. Heureusement que le comportement particulier des cultivars "Rondo" et "Finale" ayant des gènes de résistance d'un niveau assez élevé à l'égard des races les plus répandues, constitue une

source potentielle à valoriser pour l'amélioration génétique du Pois à l'antracnose causée par l'espèce *A. pisi*. Il n'en demeure pas moins que l'apparition de nouvelles races plus virulentes (type L/G), par l'un des mécanismes décrits par KIRALY (1974) et WEBSTER (1974), peut constituer un danger menaçant, si les conditions de culture venaient à favoriser leur extension. En attendant chez le Pois, l'exemple donné par la mise en évidence du pathotype (*A. pisi* L/G) illustre bien la complexité et les possibilités d'expression phénotypique des cultivars à l'égard des gènes de virulence de l'espèce *A. pisi* comme décrit par DARBY et al. (1986).

Quant aux résultats obtenus sur les conditions de transmission du pathogène par la graine, ceux-ci ont indiqué comment l'action indirecte et déterminante de la température, influence le passage du champignon de la graine à l'épicotyle et, ultérieurement, son installation au niveau des organes aériens de la plantule.

D'une manière générale, les températures élevées favorables à une levée plus rapide, semblent réduire la transmission du champignon. Par contre, aux températures assez basses, la vitesse de la levée étant ralentie, le champignon a le temps de s'installer avant que les plantules ne lèvent. Les conditions sont alors réunies pour permettre une transmission maximale. De même, l'action d'un autre facteur a été mise en évidence: l'imbibition des graines peut augmenter ou diminuer le degré de transmissibilité du champignon. En effet, des grains^e préalablement imbibés, ont leur vitesse globale de germination plus grande, entraînant une levée plus rapide; les plantules échappent ainsi à la contamination.

Dans les deux cas, la relation étroite existant entre la vitesse de germination et la transmission du champignon, peut s'expliquer par le fait que lorsque la levée est rapide, le pathogène n'a pas le temps de s'installer au niveau des organes de la plantule.

Ces résultats obtenus expérimentalement en laboratoire, confirment nos observations faites à la suite d'essais réalisés dans différentes conditions climatiques en Algérie (BOUZNAD, 1976). En étudiant l'incidence d'un lot de semences de Pois contaminé par *A. pisi*, dans différentes zones de cultures, nous avons constaté que les dégâts étaient beaucoup plus importants dans les zones où les basses températures avaient retardé la levée de trois semaines.. En revanche, dans les zones où un climat plus doux avait permis une levée plus rapide, l'attaque était moindre.

Ces résultats sont comparables aux observations rapportées par LIMASSET et DARPOUX (1951), à propos de l'action des basses températures sur la transmission des pathogènes. Dans la même optique, ANSELME (1967) considère que tout ce qui peut favoriser un ralentissement de la croissance d'une plantule, augmente les chances de contamination.

Dans le cas de la transmission de l'antracnose du Pois aussi bien par les semences que par les débris de culture, nous pouvons supposer de la même façon que tout facteur qui contribue au ralentissement de la levée, favoriserait une contamination des plantules dans le sol.

Le dernier aspect de l'étude du pouvoir pathogène de l'A. pisi, a été consacré aux déterminants génétiques de l'hôte et du pathogène sur la transmission de l'antracnose du Pois par la semence. Universellement, il est bien connu que le développement d'une maladie quelconque n'est pas uniquement lié aux seules conditions climatiques: températures et humidité parmi les plus importants. D'autres facteurs liés au pathogène lui-même et à l'hôte, conditionnent l'établissement de la maladie.

Dans le cas de la transmission de l'A. pisi par la graine, nous avons montré qu'elle était également déterminée par le degré de compatibilité de l'hôte avec le pathogène. Ainsi, en comparant des cultivars sensibles avec des cultivars résistants, les plus forts taux de transmission sont obtenus avec les cultivars sensibles. De même, les plus forts pourcentages de transmission sont généralement observés avec les races plus virulentes. Cependant, les écarts liés à la nature génétique sont plus réduits comparativement à l'action de la température.

3.5. ETUDE EN M.E.B. DES RELATIONS HOTE-PARASITE:
GERMINATION ET PENETRATION DE L'*Ascochyta pisi*
CHEZ UN HOTE SENSIBLE ET UN HOTE RESISTANT

Les résultats précédents ont montré que certains cultivars de Pois présentaient à l'égard de certaines races d'*A. pisi*, un niveau de résistance assez élevé. L'existence de ce type de matériel végétal nous a incité à approfondir nos connaissances sur les modalités de la résistance du Pois à ce pathogène. A cet effet, tous les stades de la germination et de la pénétration du champignon ont été analysés en M.E.B. sur deux types d'organes: les folioles et les épicotyles. Au préalable le matériel végétal sain a fait l'objet d'une étude détaillée.

3.5.1. PRESENTATION DE L'HOTE SAIN: ASPECT DE LA
SURFACE CUTICULAIRE DU POIS (*Pisum sativum*)

Les observations présentées dans les figures montrent que la surface épidermique des cultivars de Pois étudiés est entièrement recouverte de cires cuticulaires. Alors que le nombre de stomates foliaires est peu variable d'un cultivar à l'autre (Figs 92 et 93), par contre l'importance de la couche épicuticulaire varie en fonction des facteurs suivants:

- L'organe végétal

L'examen de la surface des différents organes révèle qu'il y a davantage de cires cuticulaires sur les folioles (Figs 94 et 95) que sur les entre-noeuds ou épicotyles (cf. fig. 19^o). De même, l'aspect cristallin des cires varie d'un organe à l'autre. Les arêtes sont différentes

Fig. 92 : Aspect général en M.E.B. de la face supérieure d'une foliole de Pois d'un cultivar résistant. A cette échelle, seuls les stomates (➔) et les limites cellulaires sont identifiables.

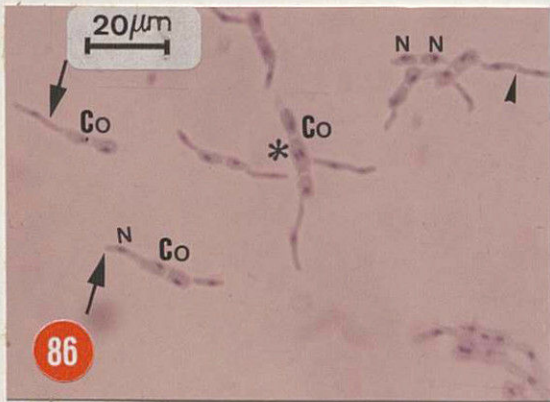
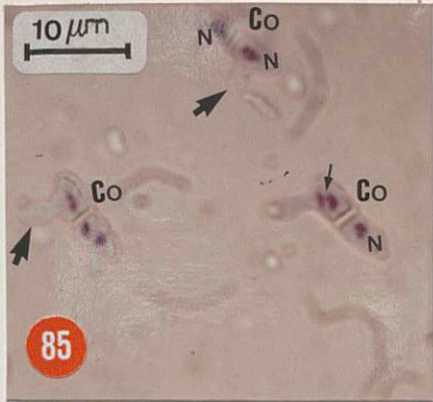
Fig. 93 : Mêmes observations au niveau de l'hôte sensible. On ne distingue pas de grandes différences avec la figure précédente.

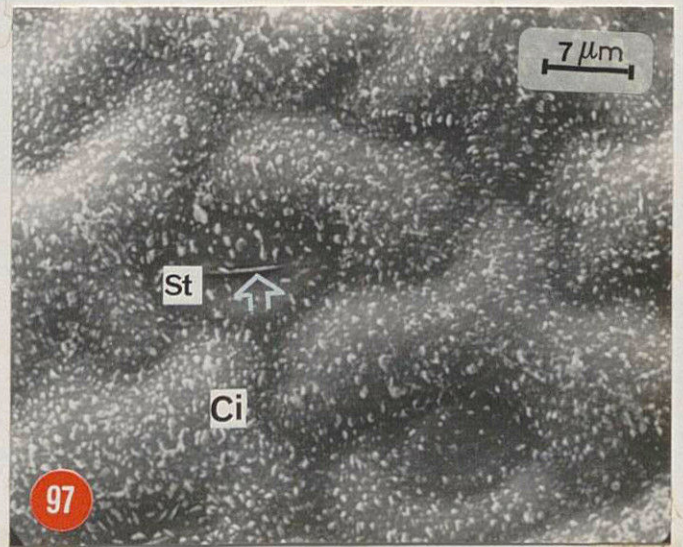
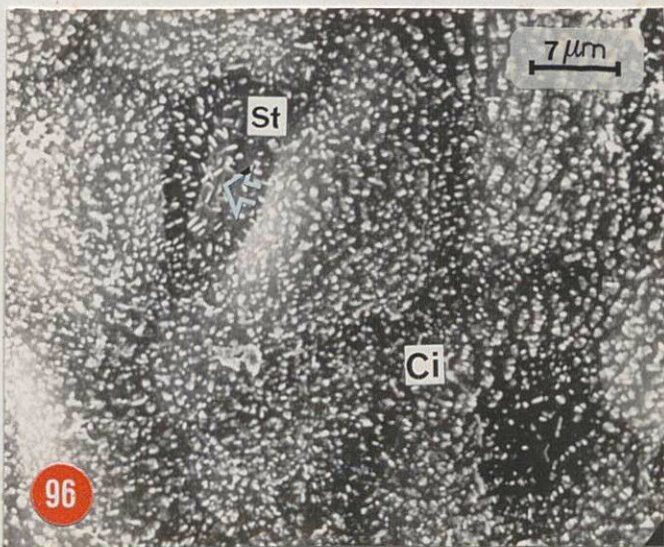
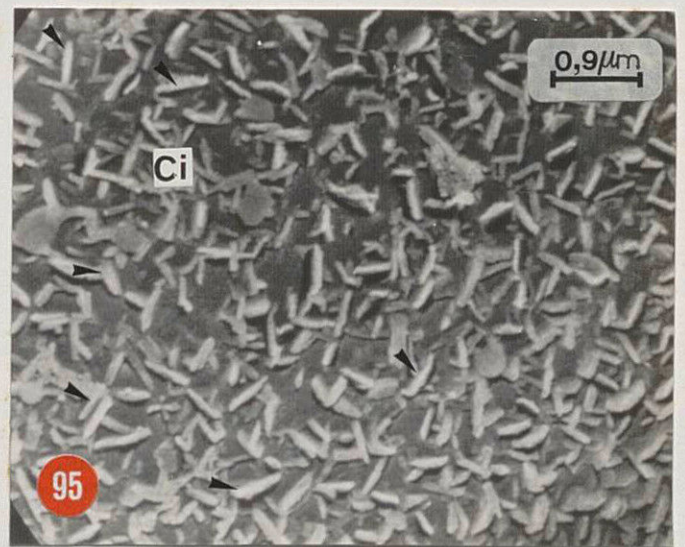
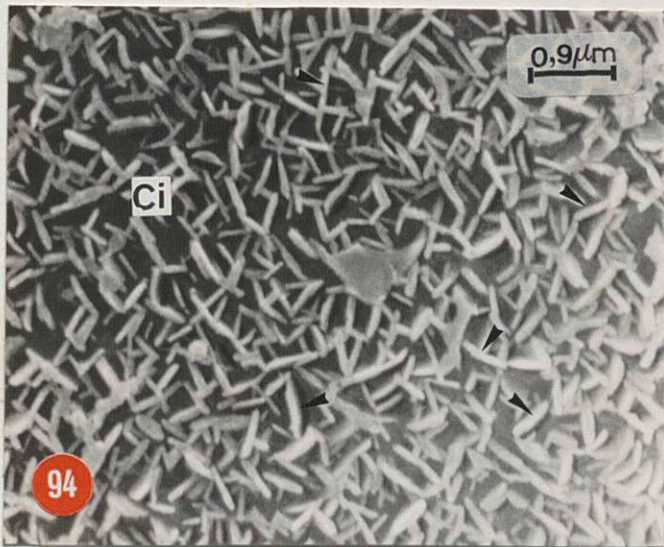
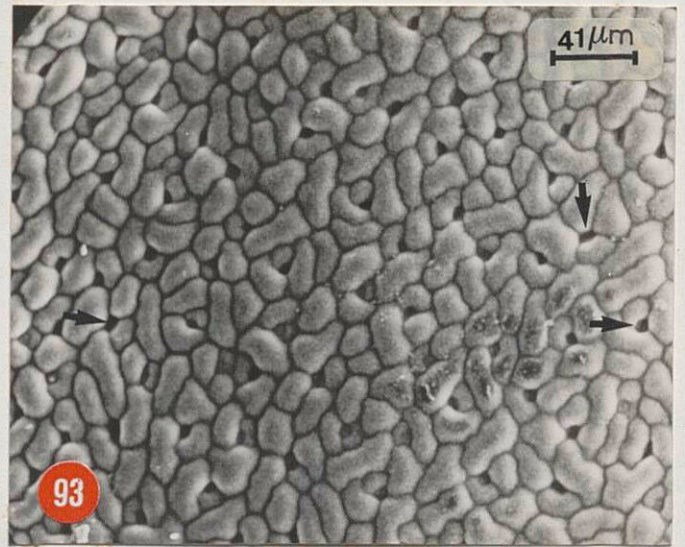
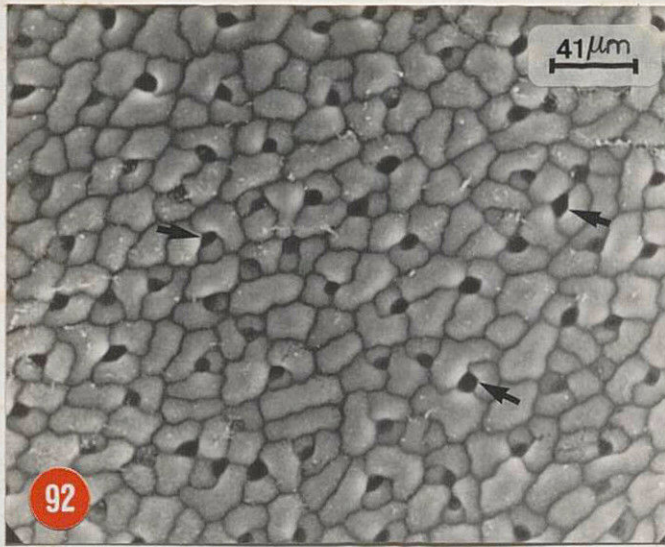
Fig. 94 : Détail de la surface supérieure des folioles de l'hôte résistant. La technique du cryo-scanning met en évidence l'abondance des cires épicuticulaires (Ci). Les arêtes des cristaux de cires sont souvent perpendiculaires les unes aux autres.

Fig. 95 : Détail de la surface supérieure des folioles de l'hôte sensible. La densité des cires est légèrement moins importante.

Fig. 96 : Aspect des cires de la face inférieure des folioles de l'hôte résistant. Morphologiquement, les cristaux de cires sont différents de ceux observés sur la face supérieure.

Fig. 97 : Aspect des cires de la face inférieure de l'hôte sensible. La densité des cristaux est moins importante que celle observée précédemment chez l'hôte résistant. Dans les deux cas, les stomates indiqués par la flèche blanche sont moins riches en cires que le reste de la surface.





selon qu'il s'agit d'entre-noeuds ou de folioles. Elles sont allongées, large en profondeur et souvent à angle droit sur les folioles (Figs 94 et 95). Au niveau des épicotyles et de la face inférieure des folioles, les cires cuticulaires sont d'aspect épineux et de taille beaucoup plus réduite (Figs 96et97).

- L'âge de l'organe végétal

Une étude plus détaillée des folioles a été réalisée par LAMARQUE et ALLARD (Communication personnelle, 1985), en fonction de leur stade évolutif. Ces chercheurs ont constaté une certaine hétérogénéité des dépôts de cires cuticulaires; pour un même organe, les régions les plus évoluées présentent des amas de cires cuticulaires beaucoup plus denses.

- La variété

Contrairement à ce qui a été observé au niveau des types d'organes (folioles ou entre-noeuds) et selon le stade végétatif, la densité des cires cuticulaires varie relativement peu d'un cultivar à l'autre. Cependant, même si la différence reste faible, il n'en demeure pas moins que par rapport aux cultivars sensibles "Frisson et Merveille de Kelvedon", (Figs 94et96). Les cultivars résistants "Finalé" et "Rondo" (Figs 95et97) ont une densité plus élevée de cires notamment au niveau des épicotyles. La différence entre la face inférieure et la face supérieure des folioles y est plus accentuée.

3.5.2. MODALITES DE GERMINATION DE L'*Ascochyta pisi*
SUR UN HOTE SENSIBLE ET UN HOTE RESISTANT

Lorsque nous avons étudié la germination des spores d'*A. pisi* in vitro (goutte pendante, lame gélosée ou support en cellophane), nous avons décrit une germination se faisant essentiellement par le développement de deux tubes germinatifs. Par contre, dans les observations réalisées in vivo et présentées par les figures 98 à 103, la germination des spores à la surface de l'hôte donne lieu à la formation de 1 à 4 tubes germinatifs. D'un point de vue physiologique, cette germination des spores paraît donc être modifiée par la nature du substrat. Sur un même type d'organe, l'étude comparative effectuée entre un cultivar sensible et un résistant, ne montre pas de différences sensibles ni sur le pourcentage de germination, ni sur la longueur des tubes germinatifs (tabl.22).

Par contre, les différences de longueur sont importantes selon l'organe considéré: foliole ou épicotyle. La croissance des tubes germinatifs précédant la pénétration est très réduite sur épicotyles ($< 2 \mu\text{m}$ Fig. 102), alors que sur folioles, leur longueur peut dépasser $25 \mu\text{m}$ (Fig.103).

Ce comportement variable de l'*A. pisi* à la surface de l'hôte est plutôt lié à l'importance de la présence des dépôts de cires cuticulaires, qu'à la résistance phénotypique de l'hôte.

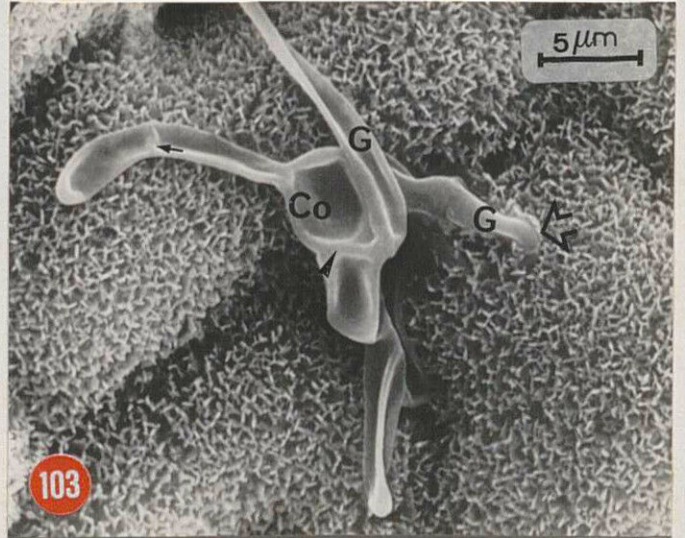
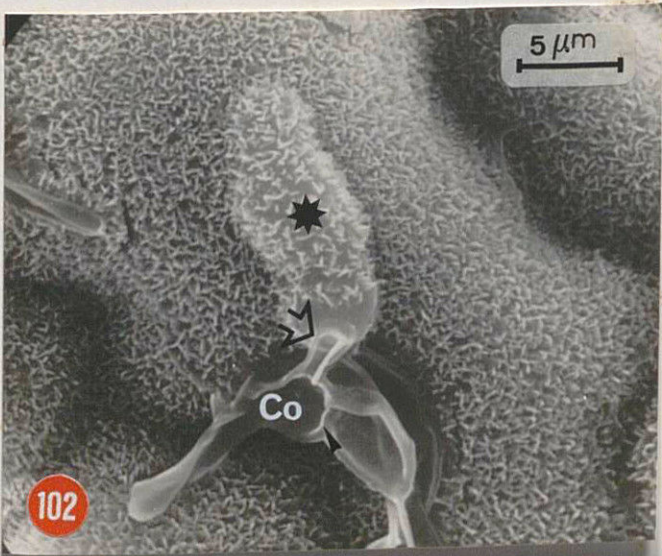
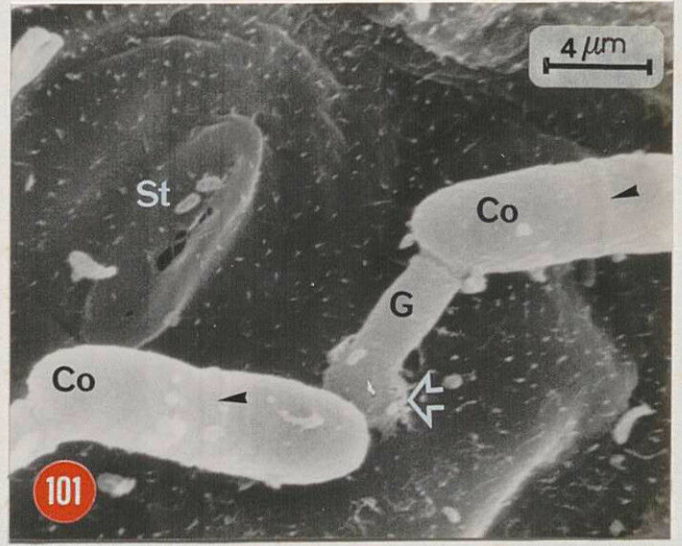
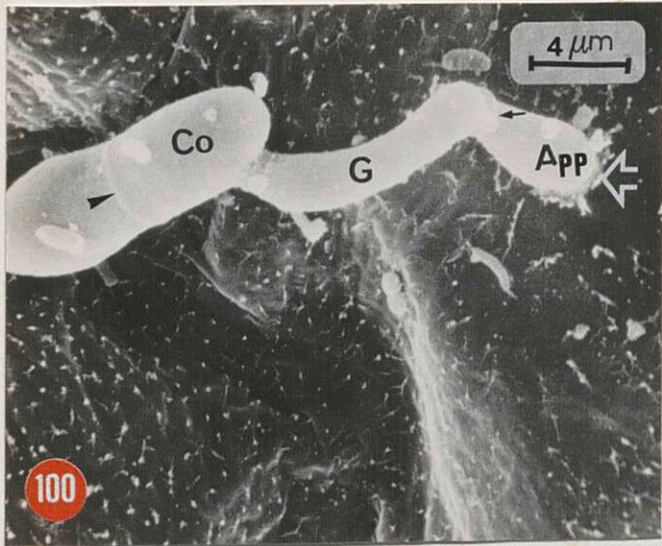
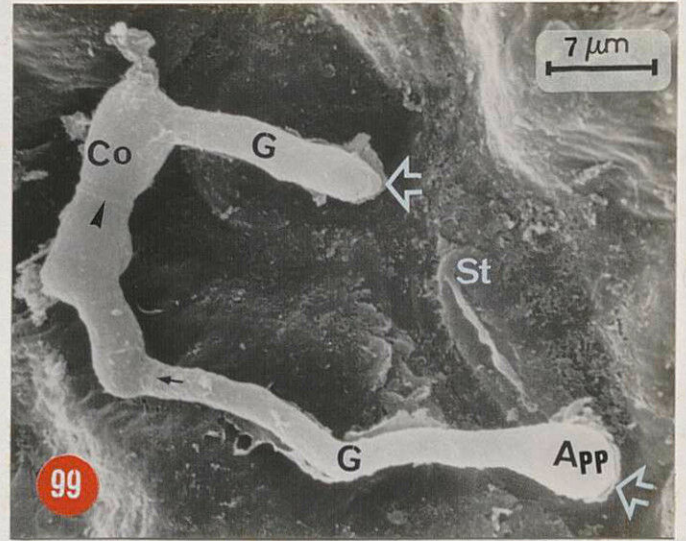
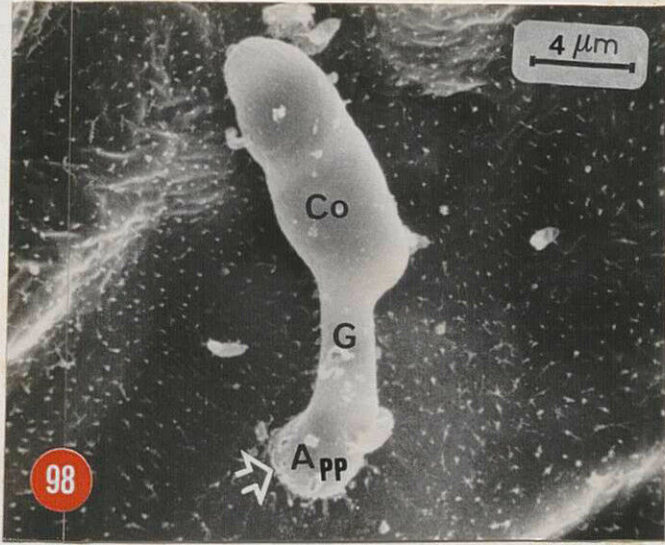
Fig. 98 : Observations en M.E.B, après la technique du point critique, d'une conidie (Co) germant avec un seul tube germinatif (G). Ce dernier relativement court, pénètre après formation d'un appressorium (App).

Fig. 99 : Aspect d'une conidie (Co) germant avec deux tubes germinatifs (G), de longueur inégale. La pénétration (→) de l'un d'eux se fait après formation d'un appressorium (App) . Le point de pénétration est assez proche d'un stomate (St).

Figs 100 et 101 : Autres cas de germination des conidies (Co) avec un seul tube germinatif (G) et pénétration après formation d'un appressorium (App). Noter la bonne conservation du matériel fongique (► et →).

Fig.102 : Germination d'une conidie (Co) avec trois tubes germinatifs (G). Au point de pénétration (→), on observe un renflement sous cuticulaire (★).

Fig.103 :Germination d'une conidie (Co) avec émission de quatre tubes germinatifs (G). L'un d'entre eux pénètre (→) sans formation d'appressorium. Comparativement aux observations après le point critique, le cryoscan conserve bien la surface foliaire, mais le matériel fongique est très souvent affaissé.



Tabl. 22: Résultats de la germination des pycniospores d'*Ascochyta blight* Lib. obtenus à partir d'observations en M.E.B.

	F o l i o l e s				E p i c o t y l e s			
	% Germ.	Longueur en μm	Pénétration sans appressorium	Pénétration avec appressorium	% Germ.	Longueur en μm	Pénétration sans appressorium	Pénétration avec appressorium
Merveille de Kelvedon	94	25	16	49	89	15	11	57
Frisson	90	23	14	59	92	17	13	65
Rondo	89	27	13	48	85	19	9	54
Finale	93	22	10	43	87	20	11	47

3.5.3. MODALITES DE PENETRATION DE L'*Ascochyta pisi*
CHEZ LES COUPLES COMPATIBLE (SENSIBLE) ET
INCOMPATIBLE (RESISTANT)

Après avoir étudié quelques aspects du processus germinatif des spores à la surface de l'hôte, nous avons examiné ensuite l'initiation de l'infection. Nous nous sommes alors intéressés plus particulièrement aux voies et aux modalités de pénétration du champignon, en relation avec le type de matériel biologique.

3.5.3.1. STRUCTURE FONGIQUE DE PENETRATION

Comme cela a été largement mentionné dans la littérature (ELLINGBOE, 1968; AIST, 1976; RIJKENBERG et al., 1980; WYNN et STAPLES, 1981; KOLATTUKUDY, 1985), la pénétration des plantes par les champignons se fait, soit passivement à travers les ouvertures naturelles et les blessures, soit activement à travers la surface intacte de l'hôte. Dans le deuxième cas, la pénétration directe de la cuticule est soit mécanique, par les forces exercées par le champignon, soit enzymatique par dégradation de la cuticule en sécrétant des cutinases, ou encore par la combinaison des deux à la fois.

Les résultats présentés dans ce chapitre tentent d'élucider les modalités de pénétration du Pois par *A. pisi*.

Les figures 104 à 109 montrent que la pénétration de l'hôte est très souvent précédée par la formation d'un renflement de la zone terminale du tube germinatif. Cet organe, en forme d'ampoule, appelé communément appressorium, permet au champignon de se fixer avant de pénétrer. A partir de ce stade, les événements conduisant à la pénétration du parasite dans les cellules de l'hôte ne sont plus observables.

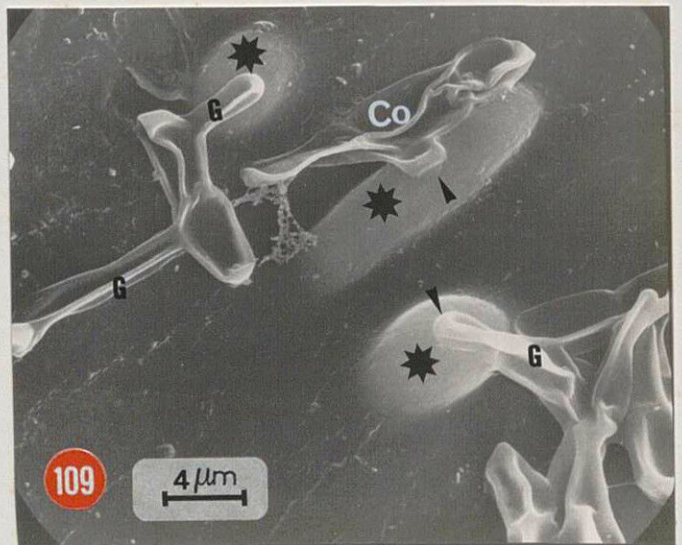
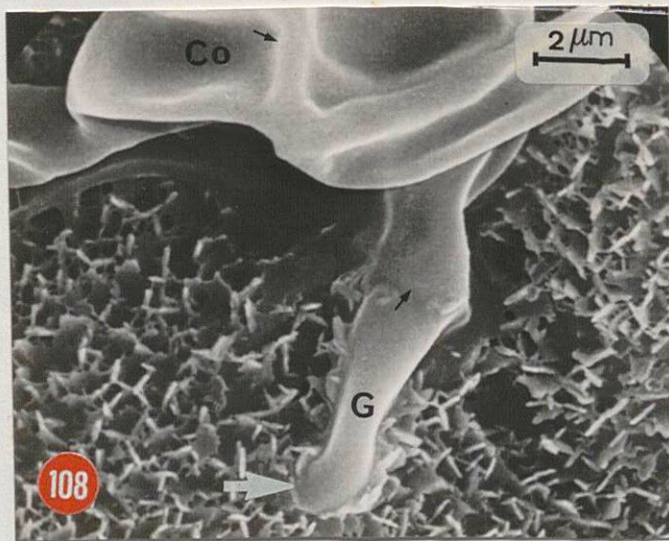
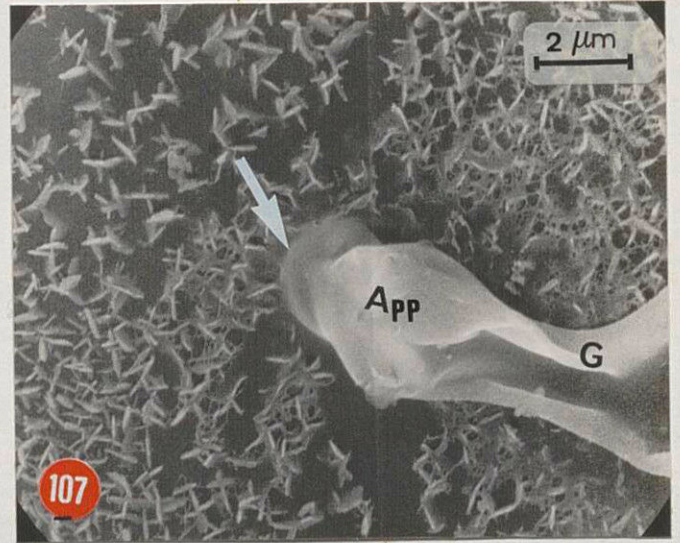
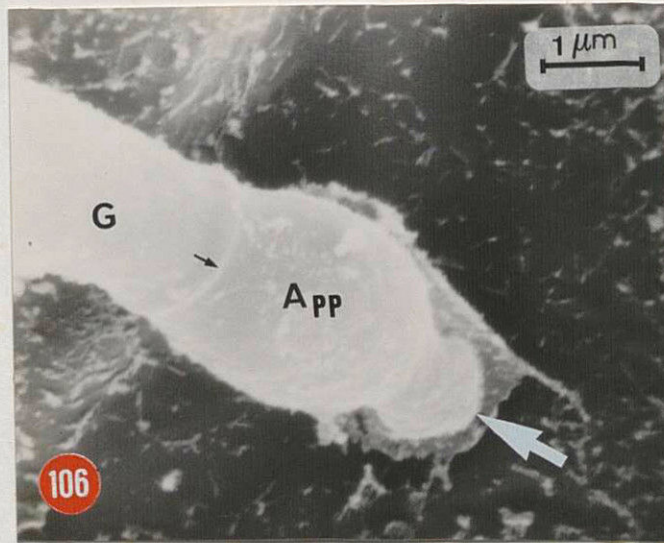
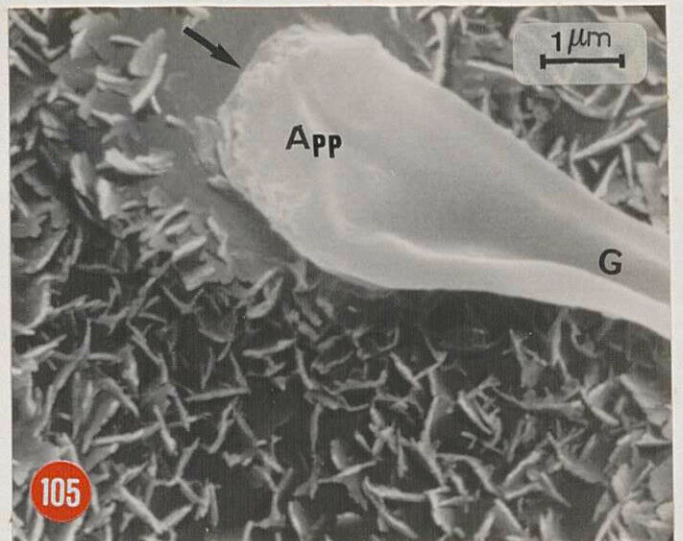
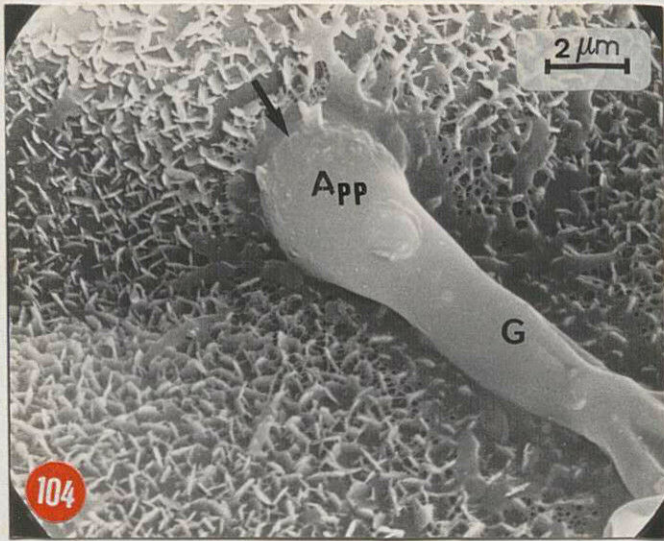
Figs 104 et 105 : Détail de tubes germinatifs (G). Au point de pénétration (→), l'hyphe germinatif se termine par un renflement : l'appressorium (App). Il conditionne très souvent la pénétration.

Fig. 106 : Détail de la partie terminale d'un appressorium (App). Son extrémité forme une pointe ou "peg" (→) qui permet très probablement au champignon de perforer la cuticule et de pénétrer. La cloison (→) indique que l'appressorium (App) est un organe qui se différencie à partir de l'hyphe germinatif.

Fig. 107 : Détail d'un autre appressorium (App), avec sa pointe de pénétration aplatie contre les cires cuticulaires.

Fig. 108 : Détail d'un tube germinatif (G) pénétrant à travers les cires sans formation d'appressorium. Au point de pénétration indiqué par la flèche blanche, l'hyphe n'est pas renflé.

Fig. 109 : Aspect de la germination de plusieurs conidies (Co) à la surface des épicytles. Les pénétrations (→) interviennent par des tubes germinatifs relativement courts et entraînant la formation d'énormes renflements vésiculaires sous-épidermiques (★).



Cependant, les figures 106 et 107 suggèrent l'éventualité d'une pénétration par l'intermédiaire d'un organe assez pointu, capable de perforer la cuticule. Les auteurs anglosaxons désignent par "peg", cette partie terminale pointue, qui permet à certains champignons de pénétrer dans l'hôte. Notons toutefois que dans quelques cas il y a pénétration sans formation d'appressorium (Fig. 108).

Dans de nombreux cas, nous avons également observé la formation d'un renflement sous-cuticulaire en forme de fuseau ou d'ampoule (Fig. 109). Celui-ci est nettement visible avec les épidermes des épicotyles moins pourvus de cires cuticulaires. Il est identique pour les deux couples compatible et incompatible.

Nous pensons qu'il s'agit, soit de la formation d'un "appressorium" sous-cuticulaire, soit d'une augmentation de la taille de l'hyphe infectieuse qui provoque un décollement de la cuticule et de la paroi épidermique.

3.5.3.2. VOIES ET DELAIS DE PENETRATION

Indépendamment du niveau de sensibilité ou de résistance génétique du Pois à l' *A. pisi*, la pénétration du pathogène se fait exceptionnellement par les stomates (Fig. 110) ou plus fréquemment dans le cas de pénétration tardives. Sinon, il arrive même souvent que le tube germinatif passe au dessus d'un stomate sans montrer une quelconque tentative de pénétration (Fig. 111).

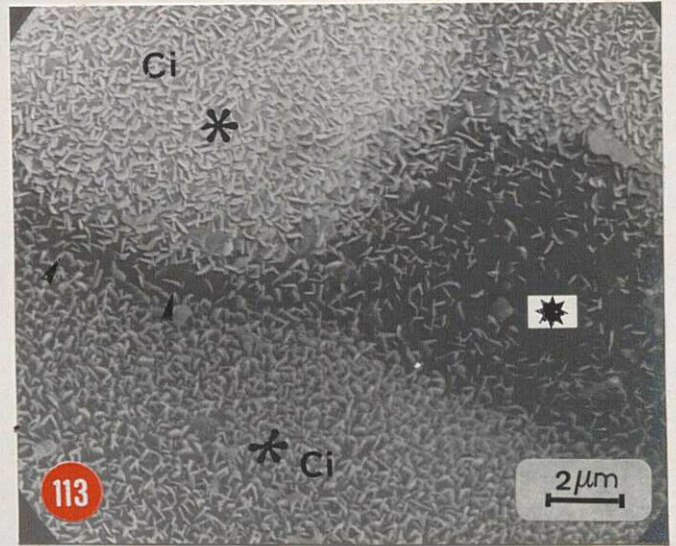
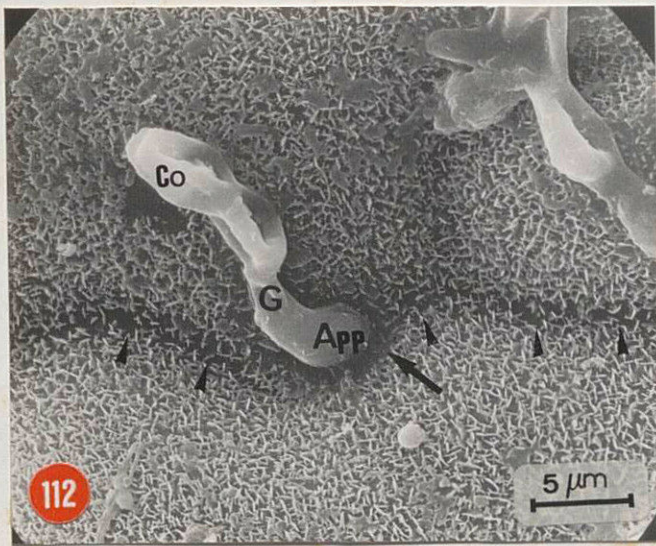
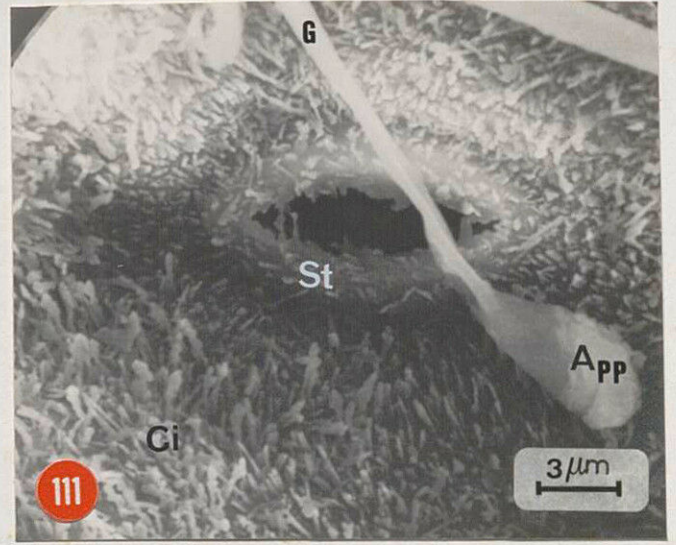
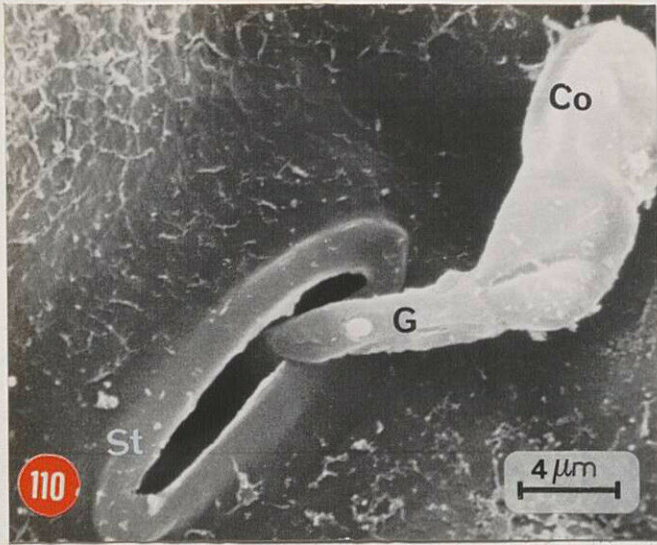
Fig. 110 : Pénétration d'un tube germinatif (G) à travers un stomate (St). Noter l'absence d'appressorium.

Fig. 111 : Hyphes germinatives (G) passant au-dessus d'un stomate (St) sans y pénétrer. La formation de l'appressorium (App) se fait plus loin.

Fig. 112 : Exemple de pénétration préférentielle au niveau des limites cellulaires (►). Le tube germinatif (G) s'est dirigé manifestement vers la zone de moindre résistance (moins de cires) pour former un appressorium (App).

Fig. 113 : Mode de répartition des cires épicuticulaires (Ci) en fonction de la topographie superficielle de l'hôte. Les zones synclinales (✱) sont plus riches en cires que les zones anticlinales (►) entre deux cellules et encore moins entre plusieurs cellules (✱).

Figs 114 et 115 : Aspect général des tissus de l'hôte durant les premiers stades de la formation de la nécrose. Deux zones bien différentes peuvent être distinguées : une zone de cellules normales (o) et une zone où les cellules se sont affaïssées (✱) sous l'action des hyphes mycéliens.



En revanche, l'entrée des tubes germinatifs s'effectue le plus souvent directement à travers la cuticule. Il arrive que la pénétration se fasse préférentiellement aux points de jonctions des cellules épidermiques contigües (Fig. 112). Ces zones sont souvent moins riches en dépôts de cires cuticulaires (Fig. 113).

En ce qui concerne les premiers stades de la pénétration du champignon, des observations échelonnées dans le temps, ont permis d'en préciser les délais. Plus les tubes germinatifs ont un développement superficiel important, plus le début de la pénétration est retardé. Ces délais sont déterminés par le type d'organe considéré, folioles ou épicotyles et, notamment, par l'importance des cires cuticulaires. Les temps les plus courts ont été observés au niveau des organes les moins riches en cires.

D'une manière générale, la pénétration chez les couples compatibles intervient à partir de 12h d'incubation. Entre 16 et 21 h elle est relativement abondante et au-delà de la 30^{ème} heure, le feutrage mycélien est tel qu'il devient difficile d'établir une notation. Pour les hôtes résistants, une légère augmentation de la croissance des tubes germinatifs a été constatée; elle se traduit par une légère réduction du nombre d'appressoria formés (cf. tableau 22).

Lorsque l'infection est effective, après 48 h d'incubation, l'initiation de la formation de la nécrose débute par un affaissement des cellules épidermiques, et entraîne une modification de l'aspect superficiel de l'hôte. (Fig. 114 et 115).

3.5.3.3. PENETRATION DE LA CUTICULE

Au cours de travaux réalisés sur les modalités de pénétration directe de la cuticule par les parasites fongiques MARTIN et al. (1982), et plus récemment KOLATTUKUDY (1985), ont mis en évidence la participation de cutinases sécrétées par *Fusarium solani* f.sp. *pisi* et par *Colletotrichum gloeosporioides* lors de la pénétration dans leurs hôtes respectifs, *Pisum sativum* et *Carica papaya*.

Une étude comparable a été menée en M.E.B. en inoculant des épicotyles et des folioles de Pois à l'aide d'une suspension de spores (10^6 spores/ml) d'*A. pisi* et de *Fusarium solani* f.sp. *pisi* contenant ou non un inhibiteur des cutinases: le Di-isopropylfluorophosphate à la concentration de 0,13 mM.

La majorité de ces inoculations artificielles a abouti à la formation d'une nécrose avec *A. pisi*, mais aucun symptôme d'attaque n'a été noté pour *Fusarium solani* f.sp. *pisi*.

Des observations de contrôle effectuées *in vitro* (sur membrane de cellophane) ont montré que la germination des spores n'a pas été affectée. A la surface des tissus, nous avons noté la germination des spores puis un allongement illimité des tubes germinatifs du *Fusarium solani* f.sp. *pisi*, sans pénétration (Fig. 116). Par contre, la germination des spores d'*A. pisi* en présence de l'inhibiteur est suivie par une pénétration du champignon (Fig. 117 à 119) dans les mêmes proportions que celles obtenues avec une suspension de spores ne contenant pas l'inhibiteur et utilisée comme témoin (Fig. 120, et 121).

Cette expérimentation est seulement préliminaire et ne permet pas de conclure à une pénétration directe exclusive de l'*A. pisi*. Un meilleur moyen serait l'utilisation d'anticorps spécifiques de la cutinase de ce champignon.

Fig. 116 : Comportement d'une conidie de *Fusarium solani* f.sp. *pisi*, en présence de l'inhibiteur de cutinase : le Di-isopropylfluorophosphate (DPF). La conidie (Co) germe normalement, cependant la croissance de l'hyphe germinatif est illimitée (flèche blanche), sans pénétration.

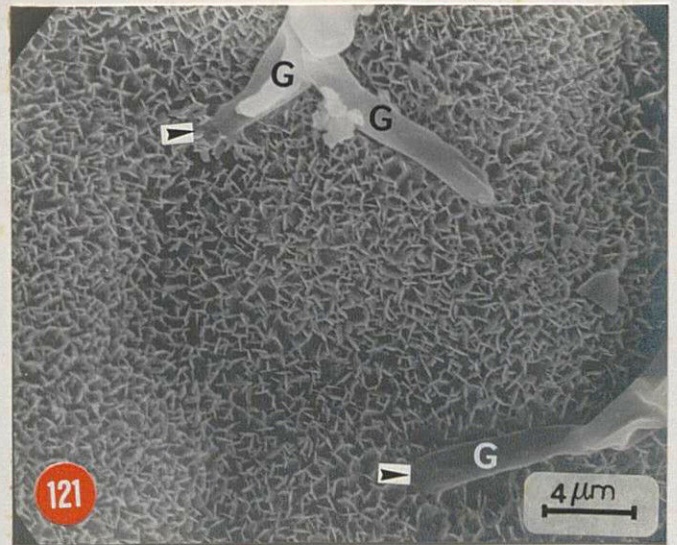
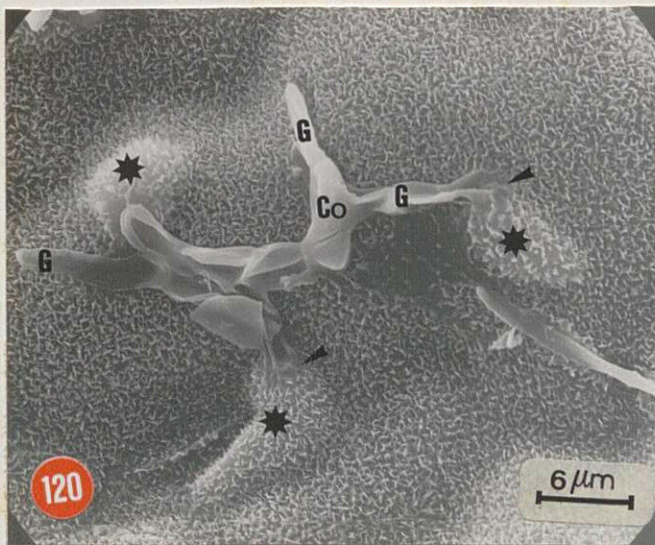
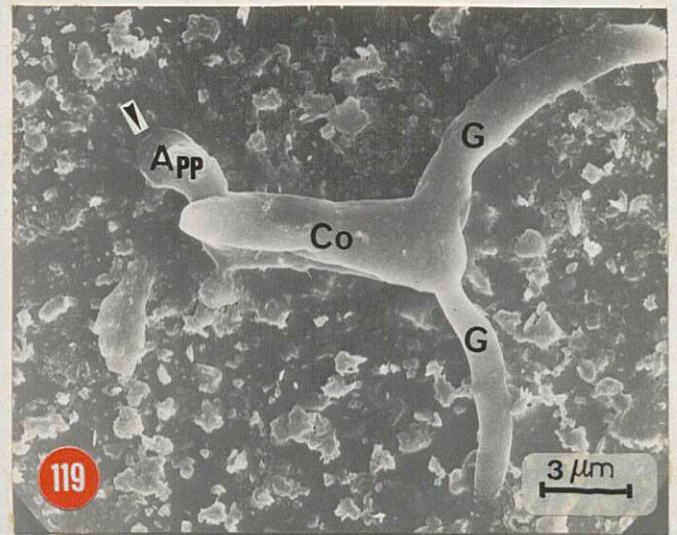
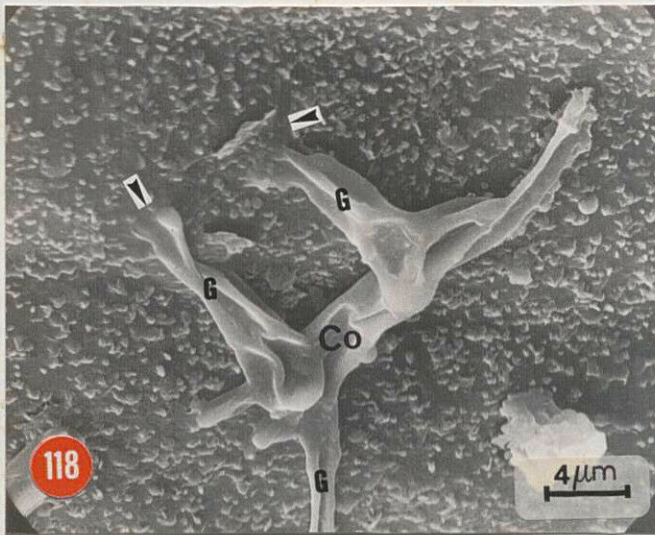
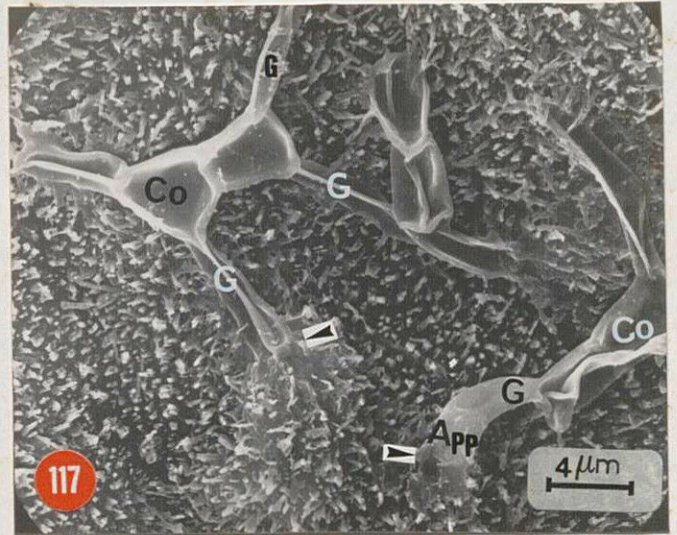
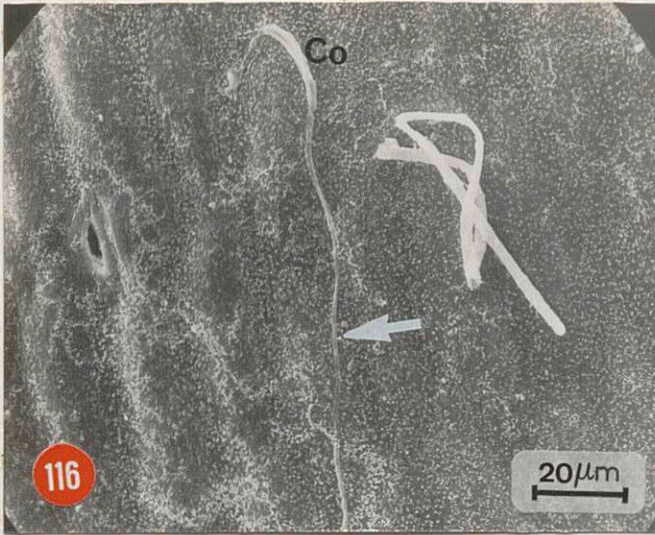
Figs 117 à 119 : Comportement des conidies (Co) d'*Ascochyta pisi* en présence du même inhibiteur, à la surface d'épicotyles sensibles. Les conidies germent normalement par plusieurs tubes germinatifs (G) et la pénétration intervient avec ou sans formation d'appressorium (App).

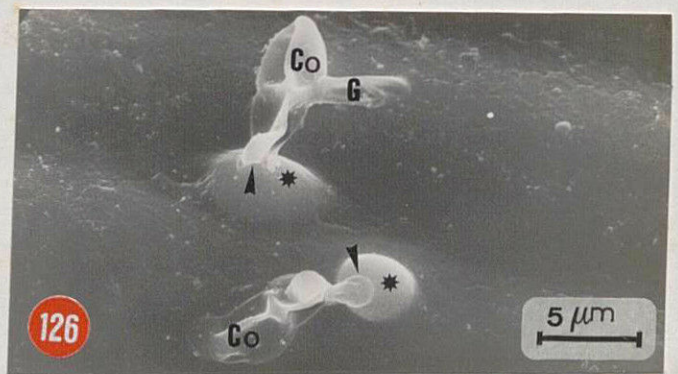
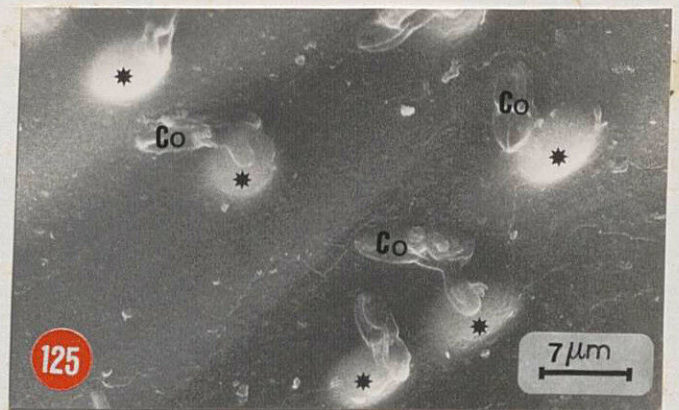
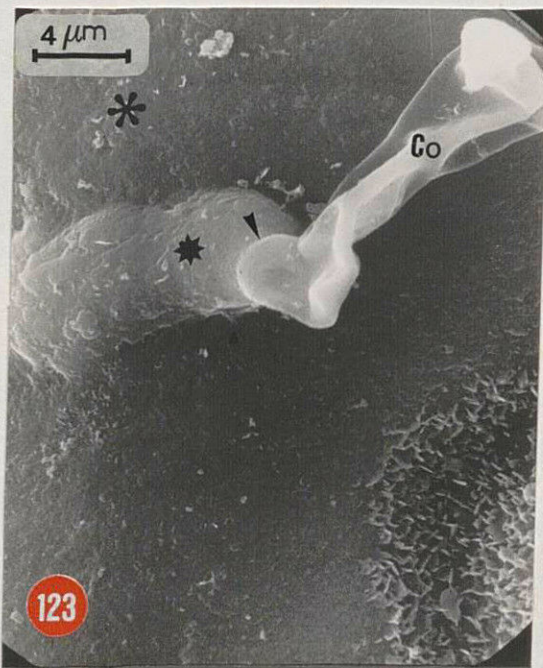
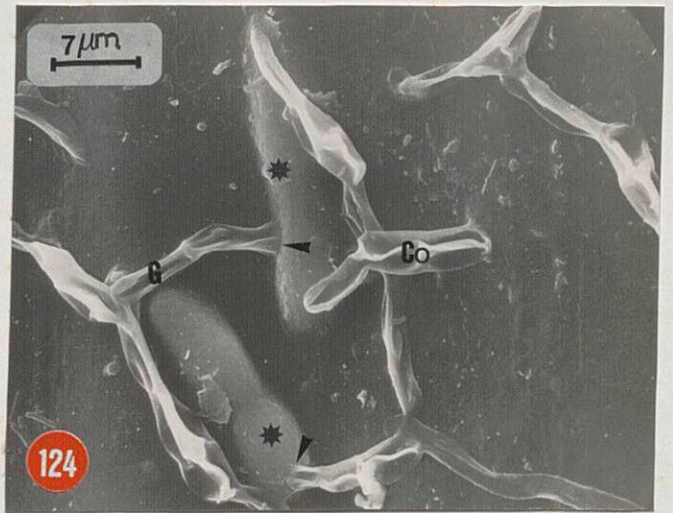
Fig. 120 : Germination des conidies (Co) d'*A. pisi* en présence du DPF à la surface des folioles. Comme les cas précédents, les conidies germent normalement par plusieurs tubes germinatifs (G) puis pénètrent en formant des vésicules sous-épidermiques (*).

Fig. 121 : Aspect de la germination et de la pénétration au niveau de l'hôte témoin inoculé par *A. pisi* sans DPF.

Figs 122 et 123 : Germination et pénétration de l'*Ascochyta pisi* sur folioles débarassées mécaniquement de leurs cires (*). La pénétration (►) intervient au niveau de la zone synclinale des cellules par un tube germinatif (G) court et formation d'une vésicule sous-épidermique (*).

Figs 124 et 126 : Aspect de la germination et de la pénétration de l'*Ascochyta pisi* sur épicotyles débarassés des cires épicuticulaires. La pénétration (►) a lieu le plus souvent par un tube germinatif très court suivi par la formation d'une vésicule sous-épidermique (*). La pénétration a lieu indifféremment aussi au niveau des zones synclinales ou anticlinales.





3.5.4. ROLE DE LA CUTICULE ET DES CIRES CUTICULAIRES COMME BARRIERE PHYSIQUE A LA PENETRATION

Les précédents résultats ont mis en évidence une assez grande variabilité quantitative et qualitative des cires cuticulaires à la surface des différents organes végétatifs du Pois. Cette hétérogénéité, accentuée par le stade de développement des plantules, se traduit par une influence marquée sur le comportement du pathogène à la surface de l'hôte. Ceci nous a amené à approfondir nos connaissances sur le rôle de la cuticule, comme barrière physique à la pénétration du champignon dans les cellules de l'hôte.

Inspiré par les travaux de MARSCHALL et RUSH (1980) ainsi que par ceux de STOCKWELL et HANCHEZ (1983), nous avons suivi, en M.E.B., les étapes de la germination et de la pénétration de l'A. pisi après avoir supprimé mécaniquement les cires épicuticulaires. Après un tel traitement, la surface épicuticulaire des folioles et des épicotyles (Figs 122 à 126) devient lisse.

Par rapport aux résultats précédemment présentés (hôtes non débarassés des cires), le comportement du champignon semble être influencé par ce traitement. Dans la plupart des cas, il y a une nette réduction de la longueur des tubes germinatifs (Figs 125 et 126) et la pénétration est plus rapide. On constate aussi qu'elle ne se fait plus systématiquement au niveau des parois mitoyennes des cellules (Fig.122).

3.5.5. DISCUSSION

En abordant pour la première fois le comportement de l'A. pisi en M.E.B., plusieurs aspects du processus initial d'infection du Pois par ce champignon ont été précisés.

Les cires cuticulaires étant considérés comme le premier obstacle rencontré par les pathogènes aériens (POLITIS et WHEELER, 1973; KOLATTUKUDY et KOLLER, 1983), la surface extérieure des organes des deux cultivars a retenu notre attention.

Les observations ainsi obtenues en cryo-scanning sur les différents types d'organes: épicotyles, faces inférieure et supérieure des folioles, nous ont permis de constater la grande variabilité et l'hétérogénéité des dépôts de cires à la surface de ces organes. Cette variation des formations cuticulaires a été largement décrite par ailleurs chez d'autres espèces de plantes (POLITIS et WHEELER, 1973; JEFFRE et al., 1976; ROYLE, 1976; MARSCHAL et RUSH, 1980).

D'une manière générale, l'aspect cristallin des cires des folioles de Pois est comparable à celui décrit également par HALLAM et JUNIPER (1971) sur ce même type de matériel végétal. Par contre, sur les épicotyles, non étudiés par ces auteurs, la densité des cristaux est beaucoup plus réduite par rapport à celles des folioles.

D'un point de vue technique, il est important de signaler que l'utilisation du cryo-scanning sur échantillon frais, sans aucun traitement chimique préalable, permet de conserver intacte la surface du végétal et d'en observer les caractéristiques physiques. En revanche par la méthode classique du point critique, la fixation et les bains de déshydratation subis par les échantillons, entraînent une dissolution des cires cuticulaires. Des résultats semblables ont déjà été mentionnés par de nombreux auteurs sur d'autres plantes (DEFOSSE et DEKEGEL, 1974; ROYLE, 1976; KUNOH, 1976 et 1981; MACNAMARA et DICKINSON, 1981; READ et al., 1983). Les données ainsi obtenues ne correspondent pas à l'aspect réel de la surface du végétal. De telles modifications rendent

difficile la compréhension des mécanismes de la germination et de la pénétration du pathogène dans l'hôte.

Cependant, un des avantages de la technique du point critique, c'est qu'elle permet une bonne conservation de la morphologie générale du champignon. Ainsi, l'utilisation complémentaire des deux techniques s'avère nécessaire pour saisir tous les détails des premiers stades de la pénétration.

L'ensemble des résultats obtenus sur le comportement de l'A. *psii* à la surface de l'hôte a établi que les événements précédant la pénétration sont assez identiques à ceux décrits pour *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. gloeosporium*, *Cladosporium fulvum*, *Botrytis cinerea*, *Erysiphe graminis* et *Uromyces phaseoli* (EHRlich et ERLICH, 1971; MERCER et al., 1971; PARBERY, 1981).

Quelle que soit la nature génétique des cultivars utilisés et le type d'organe inoculé, foliole ou épicotyle, dans tous les cas, la germination des conidies est suivie par une croissance plus ou moins longue des hyphes germinatifs; la pénétration est le plus souvent précédée par la formation d'un appressorium.

En ce qui concerne la longueur des hyphes germinatifs, des variations importantes ont été notées en relation avec la morphologie extérieure des cultivars. Il a été notamment observé un allongement plus importants des tubes germinatifs sur les organes présentant un plus grand recouvrement par les dépôts de cires (cas des folioles). Sur les épicotyles, moins riches en cires ou sur les folioles débarassées artificiellement de leurs cires, la pénétration s'effectue le plus souvent après une croissance très réduite des tubes germinatifs. De même, dans de nombreux cas, la pénétration s'initie dès que le champignon rencontre des points de

jonction des cellules épidermiques, zones relativement moins riches en dépôts cireux. Cette voie préférentielle a été assez fréquemment observée chez d'autres champignons (PRING, 1980 ; STOSEL et al., 1980; WYNN et STAPLES, 1981).

Les cires cuticulaires peuvent avoir une action inhibitrice sur la germination et sur la croissance des champignons (MARTIN, 1965, SYJNBERG, 1973; BLACKEMAN et ATKINSON, 1976; MARSCHAL et RUSH, 1980; CONTI et al., 1985). Dans le cas du Pois, les dépôts cireux auraient plutôt un rôle physique que chimique pour retarder ou empêcher l'infection. L'hypothèse d'une inhibition liée à la présence de substances antifongiques dans les cires cuticulaires n'est pas alors envisageable. A quelques exceptions près, la germination et la croissance des tubes germinatifs s'effectuent normalement à la surface des différents organes.

Pour les modalités de germination elles-mêmes, il a été constaté que contrairement à d'autres champignons pouvant donner des tubes germinatifs ramifiés comme le *Colletotrichum coccodes* (DELON, 1975), ou le *Pyrenophora teres* (HARGREAVES, 1982), à aucun moment *A. pisi*, n'a présenté ce type de formation. Cependant, la germination des conidies peut donner naissance à un ou plusieurs tubes germinatifs de longueur éventuellement inégale. La pénétration intervient alors à travers la cuticule, après formation d'un appressorium. Nous n'avons pas observé une dissolution des cires cuticulaires comme cela a été signalé pour *Erysiphe graminis* (KUNOH et al., 1978).

Contrairement aux résultats antérieurs obtenus sur le même couple *P. sativum* / *A. pisi* par HEATH et WOOD (1969) en microscopie photonique, très peu de cas d'entrée par les stomates ont été observés. Les pénétrations s'accompagnent le plus souvent par la formation d'un renflement mycélien sous-cuticulaire.

Ce type de structure, pourrait correspondre, soit à une simple augmentation de la taille de l'hyphe infectieuse, soit à un artéfact dû au décollement des cellules épidermiques, soit à la formation d'une vésicule comparable à celle décrite chez certaines espèces comme le *Colletotrichum lindemuthianum* (O'CONNELL et al., 1985) et le *Pyrenophora teres* (KEON et HARGREAVES, 1983).

Par ailleurs, des observations complémentaires obtenues en utilisant le Di-isopropylfluorophosphate, inhibiteur des cutinases fongiques (KOLATTUKUDY, 1979 et 1980), permettent, de penser que la pénétration directe de l'*A. pisi* à travers la cuticule, s'effectue plutôt mécaniquement. Par contre, dans les mêmes conditions, le *Fusarium solani* f.sp.*psii* utilisé comme témoin dans notre expérimentation, n'a montré aucune infection. En effet, le champignon germe normalement à la surface de l'hôte et donne une hyphe à croissance illimitée. Cela pourrait être dû aussi à une différence de sensibilité des cutinases des deux espèces à l'inhibiteur utilisé.

Ces comportements différents de l'*A. pisi* et du *Fusarium solani* f.sp.*psii* confirment la pénétration essentiellement enzymatique pour cette dernière espèce (KOLLER et al., 1981 et 1982; KOLLATUKUDY, 1985), et plutôt mécanique pour *A. pisi*. Cette dernière éventualité doit cependant être soumise à une nouvelle expérimentation.

Toutes ces modalités de germination et de pénétration de l'*A. pisi*, examinées sur un couple compatible (cultivar sensible) et sur un couple incompatible (cultivar résistant), ont été précisées par une observation après suppression mécanique des cires cuticulaires.

Les résultats obtenus en modifiant artificiellement la morphologie extérieure des cultivars du Pois, sont comparables à ceux rapportés par MARSHALL et RUCH, (1980) puis par STOCKWELL et ANCHEZ (1983), à propos de l'infection du Haricot par *Rhizoctonia solani*. Il a été constaté notamment

une augmentation de la sensibilité pour les cultivars de Pois compatibles et une diminution du degré de résistance pour les cultivars de Pois habituellement incompatibles. De plus, indépendamment de la résistance génétique de ces cultivars, les modalités de pénétration par *A. pisii*, se sont avérées identiques, tant à travers une cuticule de limbe débarrassée de ses cires, qu'à travers la cuticule d'un épicotyle qui en est normalement dépourvu. Ainsi l'essentiel des facteurs de résistance à l'*A. pisii* se situent chronologiquement après la pénétration.

3.6. ETUDE ULTRASTRUCTURALE COMPAREE DES RELATIONS HOTE-PARASITE CHEZ UN HOTE SENSIBLE ET UN RESISTANT

Les observations réalisées en M.E.B. sur le comportement de l'A. pisii à la surface de l'hôte, ont permis de préciser les modalités de germination du pathogène avant sa pénétration dans les tissus de l'hôte. Cependant, ces données demeurent insuffisantes pour expliquer les différences de réponse du cultivar sensible par rapport au cultivar résistant. Nous avons ensuite considéré les bases ultrastructurales du processus d'infection en essayant de préciser les modifications cytologiques et cytochimiques de l'hôte et du pathogène. Une première approche de ces événements a toujours été faite en microscopie photonique.

Nos observations ont porté d'une manière générale, sur toutes les étapes du processus d'infection depuis la pénétration jusqu'à l'établissement de la maladie.

3.6.1. STRUCTURE DES TISSUS DE L'HOTE SAIN ET DU CHAMPIGNON

Pour comprendre les mécanismes d'une interaction hôte-pathogène, il est indispensable de connaître au préalable l'état normal des tissus en l'absence de toute perturbation pathologique. De même, l'ultrastructure de l'agent pathogène en dehors de toute action des métabolites de la plante doit être précisée. Ceci est d'autant plus justifié, lorsqu'il s'agit de comparer deux niveaux de comportement alors qu'on ignore les déterminants de la sensibilité ou de la résistance.

En ce qui concerne l'hôte, les observations effectuées en microscopie photonique sur les tissus sains, ne mettent pas en évidence des différences structurales entre le cultivar sensible (Merveille de Kelvedon) et les résistants (Rondo et Finale). Tant au niveau des épicotyles (Figs. 127 et 128) qu'à celui des folioles (Figs. 129 et 130), l'organisation générale des cellules épidermiques et du parenchyme sont identiques, exceptée l'abondance de chloroplastes dans les tissus foliaires. Par contre, à l'échelle ultrastructurale, certaines différences sont décelables au niveau de la cuticule (Figs. 131 et 132).

Bien souvent, la cuticule est lisse ne présentant plus les aspérités observées en M.E.B. dues aux cires. Cependant, lorsque les cires n'ont pas été totalement altérés par les différents traitements chimiques, elles forment des indentations très marquées (Fig. 133).

Quant à la cuticule elle-même, les figures déjà présentées (Figs 131 et 132) obtenues à partir d'observations réalisées sur les épicotyles permettent de constater quelques variations. En effet, si son épaisseur est sensiblement la même dans les deux types de cultivars ($0,2 \mu\text{m}$), en revanche une structure fibrillaire caractérise le cultivar résistant (Fig. 131), alors que le sensible en est dépourvu. Sous la cuticule, la disposition des microfibrilles de la paroi varie dans le même sens: beaucoup plus fines et plus denses dans le résistant (Fig. 132). Ces différences ne concernent que la paroi tangentielle externe de l'épiderme.

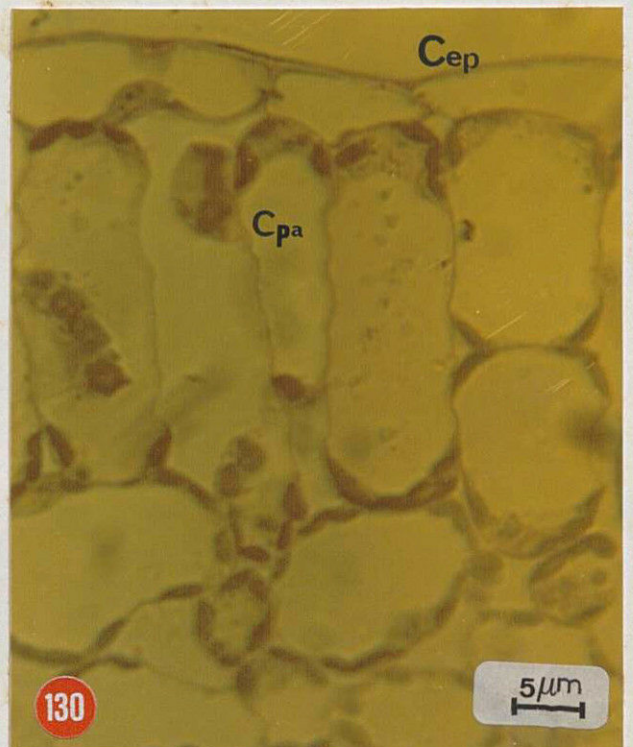
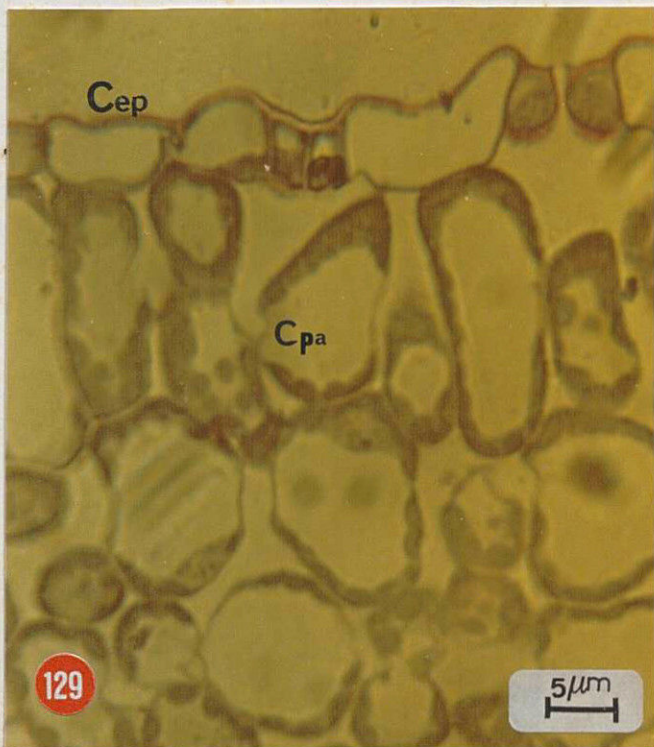
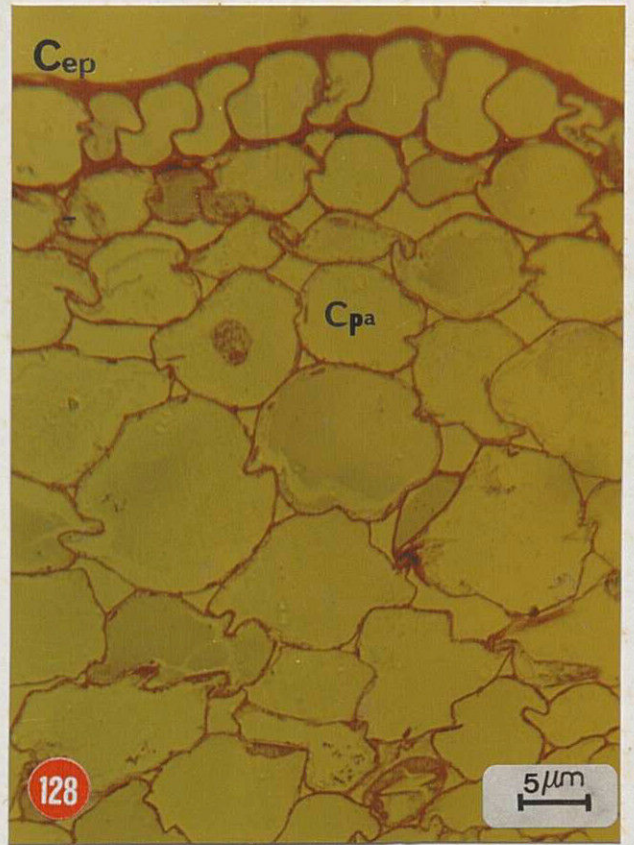
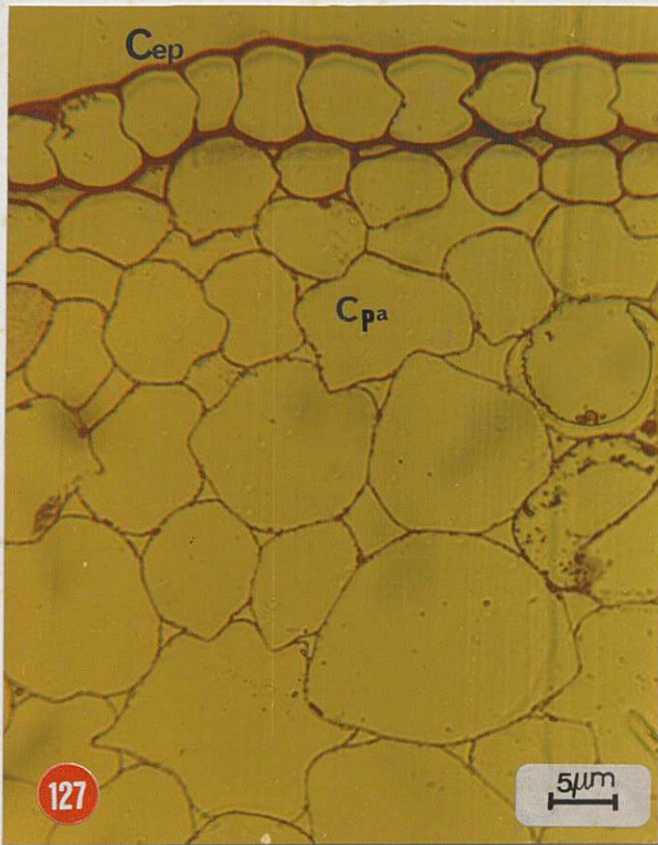
Pour le reste des organites cellulaires (chloroplastes, mitochondries, dictyosomes et noyaux), il n'a pas

Fig. 127 : Observation en microscopie photonique d'une coupe transversale d'épicotyle de Pois sensible (Merveille de Kelvedon). Deux principaux types de cellules : cellules épidermiques (Cep) et cellules du parenchyme (Cpa) relativement pauvres en chloroplastes.

Fig.128 : Coupe transversale d'épicotyle de Pois montrant la même organisation cellulaire chez l'hôte résistant (Rondo); pas de différences fondamentales.

Fig. 129 : Coupe transversale au niveau des folioles de Pois sensible. Dans ce cas, les cellules du parenchyme (Cpa) sont riches en chloroplastes.

Fig.130 : Coupe transversale au niveau des folioles de l'hôte résistant. Comme précédemment, noter la présence de nombreux chloroplastes au niveau du parenchyme (Cpa).



été observé de différences entre les deux types d'hôte (Figs 134 à 136), cependant chez le cultivar résistant, on observe la présence plus fréquente de structures vésiculaires rappelant les lysosomes (Fig. 137). Il reste à préciser que dans les deux types de cultivars, les espaces intercellulaires ne montrent aucun dépôt (Figs 134 et 137).

En ce qui concerne le champignon, les principales caractéristiques de son ultrastructure sont précisées à partir des observations relatives à la conidiogenèse (cf.

3.2.2.2.). Quelle que soit l'origine de la structure fongique considérée (conidie, cellule conidiogène ou hyphes germinatif), *L.A. pisi* présente une organisation générale comparable à celle qui est habituellement rapportée pour les champignons. A l'intérieur d'un cytoplasme granuleux assez dense et occupant la presque totalité du volume de la cellule, la plupart des organites peuvent être distingués; des différences peuvent exister d'une structure fongique à l'autre. Si précédemment on avait montré que les conidies étaient riches en produits de réserve: glycogènes, globules lipidiques (cf. notamment Figs 74, 75, 78 et 79), en revanche les hyphes germinatifs (Figs 138 et 140), présentent un nombre élevé de mitochondries témoin d'une forte activité métabolique. Ces mêmes figures de la germination permettent de distinguer que le passage du cytoplasme intervient au travers d'un pore formé par la constriction de la conidie. Aussi bien la conidie mère que le tube germinatif, sont caractérisés par une paroi épaisse, elle-même protégée par une couche mucilagineuse bien visible (Fig. 140); la couche interne de la paroi étant moins contrastée.

Figs 131 et 132 : Aspect ultrastructural de la cuticule (Cu) et de la paroi épidermique (Pep) chez l'hôte résistant et le sensible, la limite entre les deux constituants est nettement distinguable (►). Accumulation au niveau de la cuticule de l'hôte résistant (Fig. 131) d'un dépôt rectiligne (→), absent chez l'hôte sensible (Fig. 132). Sous la cuticule, la paroi épidermique (Pep) apparaît feuilletée et très compacte chez l'hôte résistant et amorphe chez l'hôte sensible.

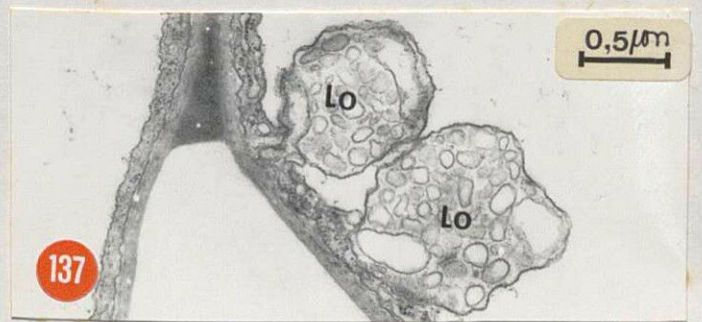
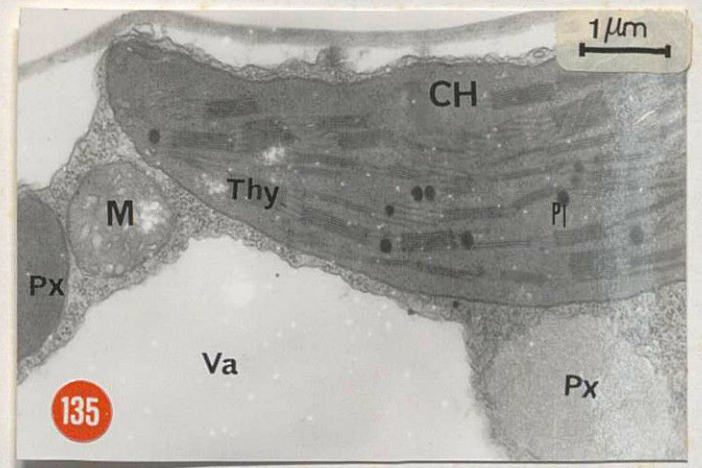
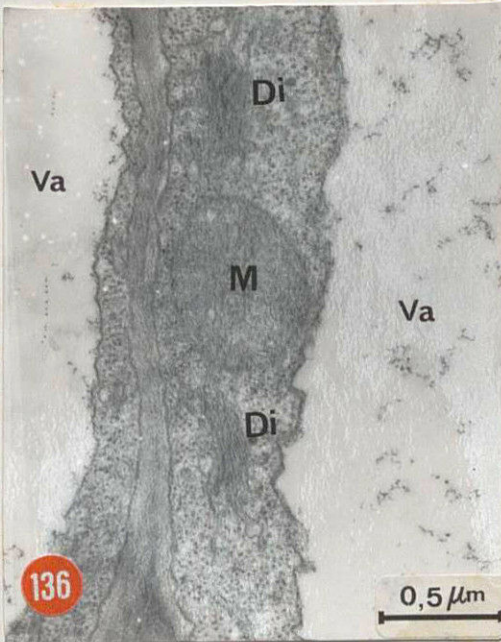
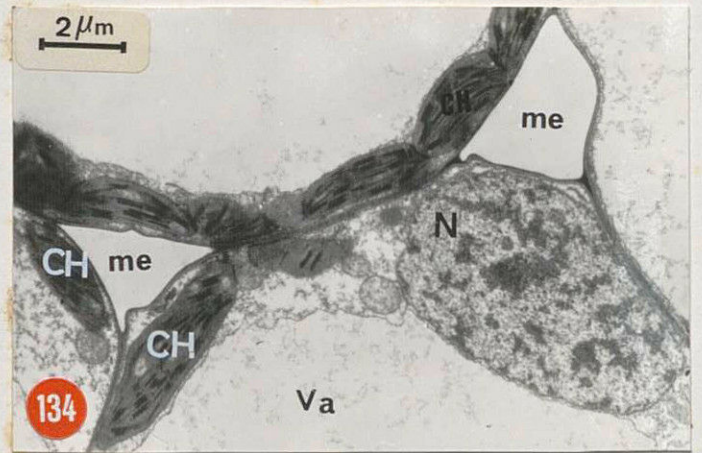
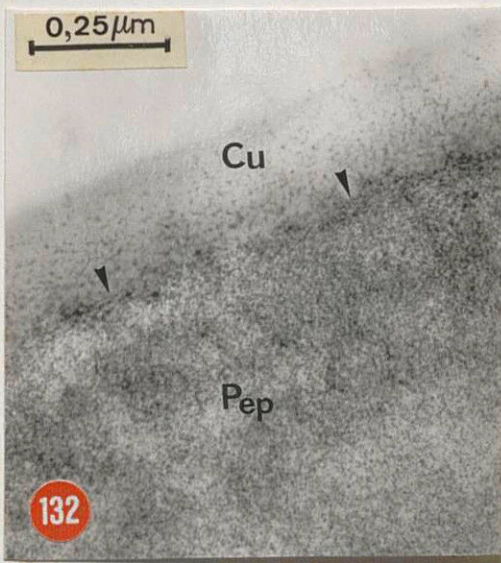
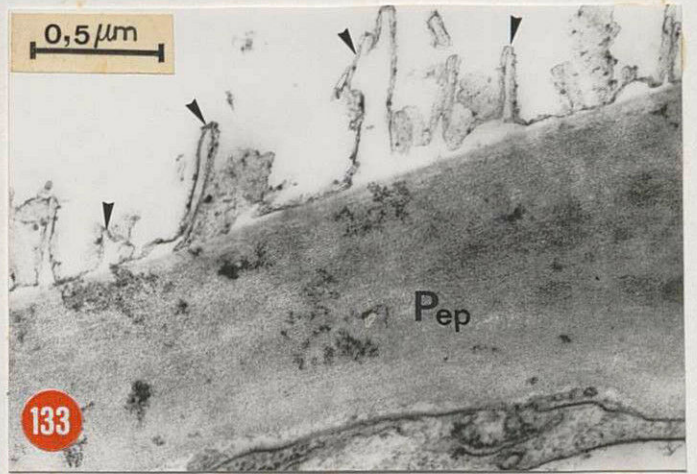
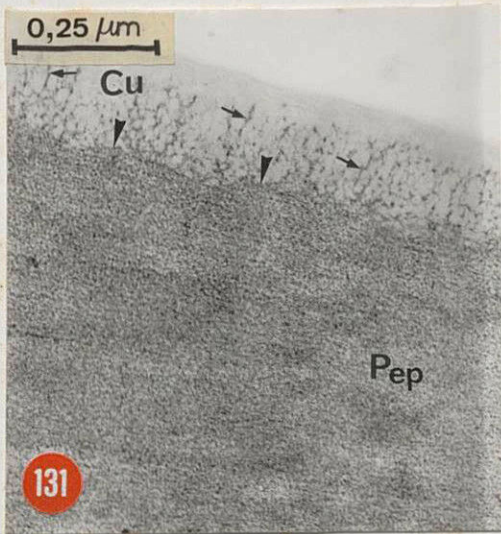
Fig. 133 : Coupe transversale montrant l'aspect des cires épicuticulaires des folioles (►) après les traitements pour la M.E.T..

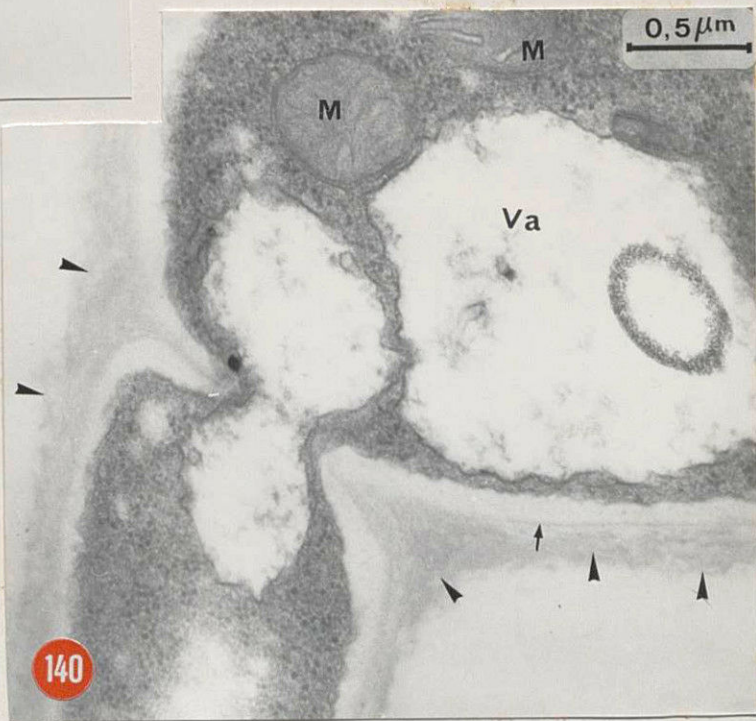
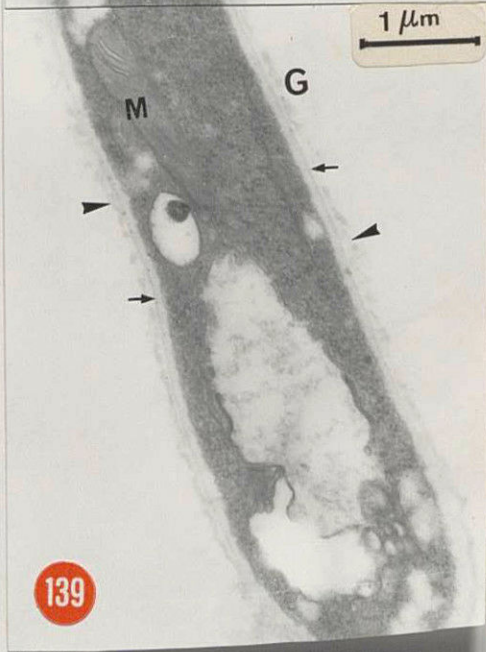
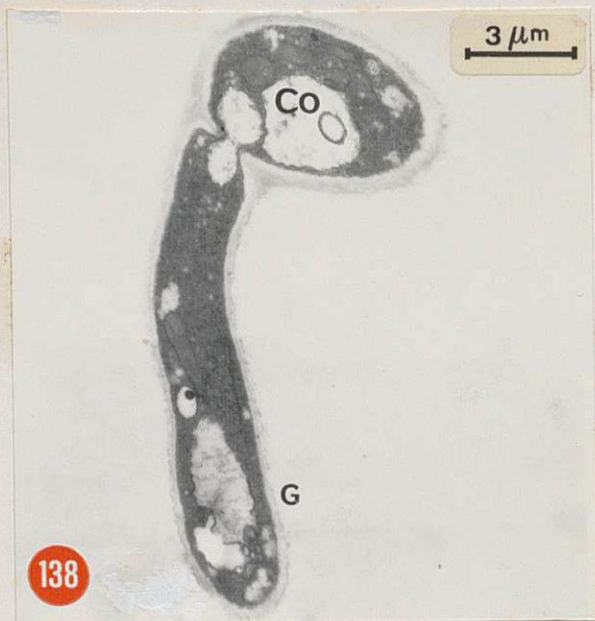
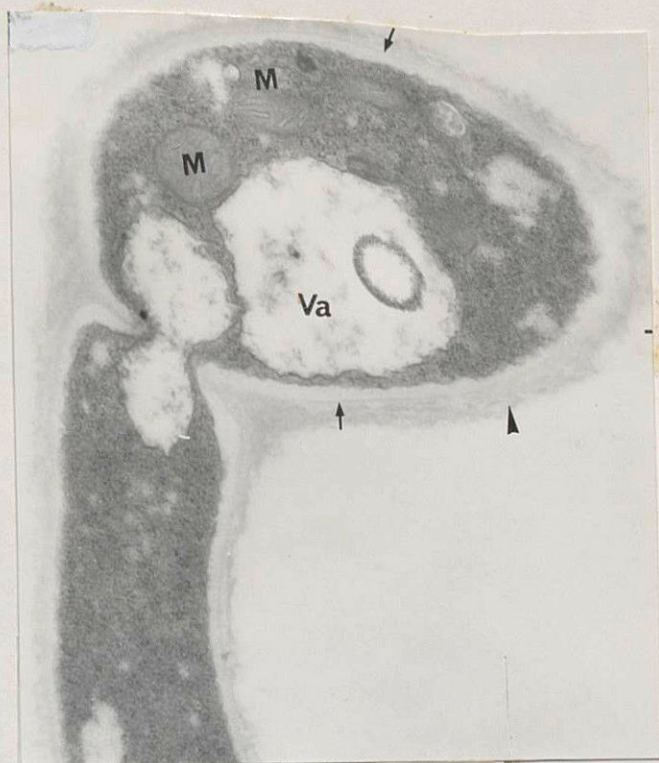
Figs. 134 à 136 : Aspect ultrastructural des cellules foliaires de Pois. Noter l'organisation classique de ces cellules avec l'absence de tout dépôt dans les méats (me).

Fig.137 : Lomasomes (Lo) souvent observés chez l'hôte résistant.

Fig.138 : Aspect général de l'ultrastructure de la germination d'une conidie (Co) d'*Ascochyta pisi*. Noter l'allongement du tube germinatif (G) et l'étranglement le séparant de la conidie.

Figs 139 et 140 : Détail ultrastructural du tube germinatif (G). Présence d'une épaisse couche de mucilage (►) protégeant la conidie et l'hyphe germinatif.





3.6.2. PENETRATION ET COMPORTEMENT DE L'*Ascochyta pisii*
DURANT LA PHASE DE COLONISATION DE L'HOTE

Les observations effectuées sur des sections transversales et paradermales de folioles infectées révèlent que, quel que soit le niveau de résistance de la plante hôte, le pathogène franchit la cuticule. Les mêmes résultats ont été obtenus à partir de coupes transversales d'épicotyles.

Immédiatement après le passage de la cuticule, l'hyphe infectieuse augmente significativement de diamètre. Ainsi, les Figures 141 à 146 permettent de distinguer, au niveau des cultivars sensibles, la formation de structures fongiques sous-cuticulaires, du type vésicules. Ces modifications morphologiques du pathogène après pénétration, expliquent les renflements observés en M.E.B. (cf. 3.5.3.1.) tant sur les cultivars sensibles que sur les résistants.

Durant cette phase de pénétration et d'installation du pathogène, une invagination de la paroi épidermique (Fig. 145), a parfois été notée chez le cultivar sensible. Elle pourrait illustrer la pression physique exercée par le champignon pour atteindre les cellules sous-jacentes.

A une période d'incubation plus tardive (48 h), l'examen des sections transversales permet de constater que la progression de l'*A. pisii* est marquée chez le cultivar sensible par une croissance latérale sous cuticulaire importante des hyphes. Celle-ci se fait très généralement à partir des renflements vésiculaires précédemment décrits (Figs 144 à 146). Chez le cultivar résistant, ce type de

Fig. 141 : Observation en microscopie photonique des premiers stades de l'infection du Pois par *Ascochyta pisi*. On remarque une colonisation sous-cuticulaire importante par le champignon (►).

Figs 142 à 145 : Détails de la pénétration et de la colonisation sous-cuticulaire, montre une partie du tube germinatif (G) ou de l'appressorium (App), à l'extérieur de l'hôte. A l'intérieur, sous la cuticule, le champignon augmente considérablement de volume prenant l'aspect de vésicule (Sv). Le champignon repousse la paroi de l'hôte (►) la(figure 145). Noter aussi la présence d'hyphes intracellulaires (Fig. 142, hy.i) et d'hyphes intercellulaires (Fig. 144, hy.e).

Fig. 146 : Ramification du champignon (►►) à partir de la vésicule sous-cuticulaire; ce comportement est également observé à la figure 145. A l'extérieur, le tube germinatif a un diamètre beaucoup plus réduit.

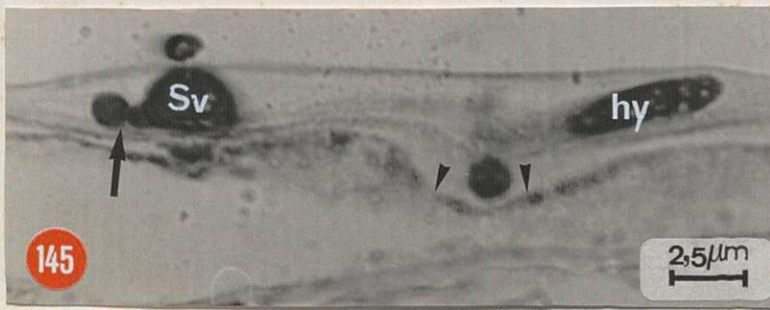
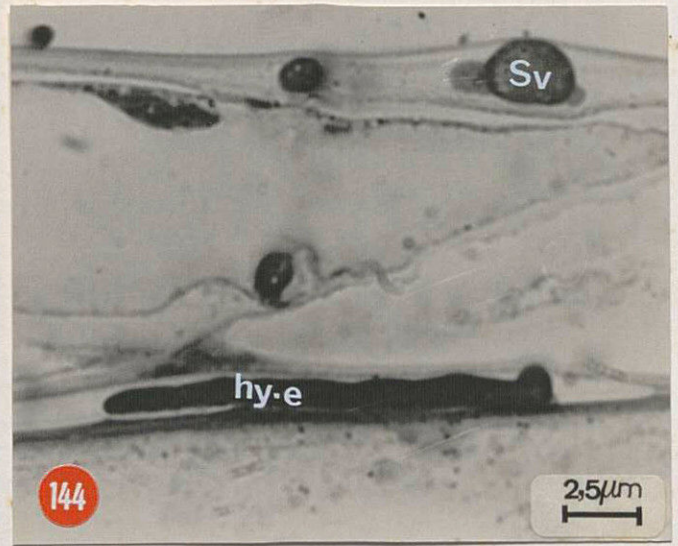
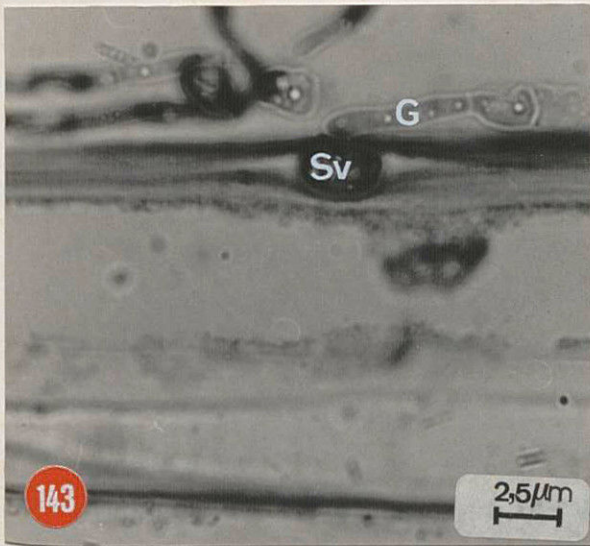
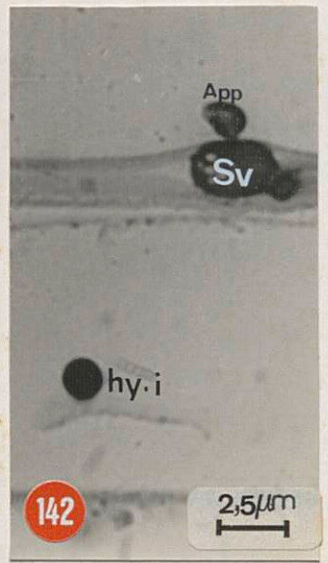
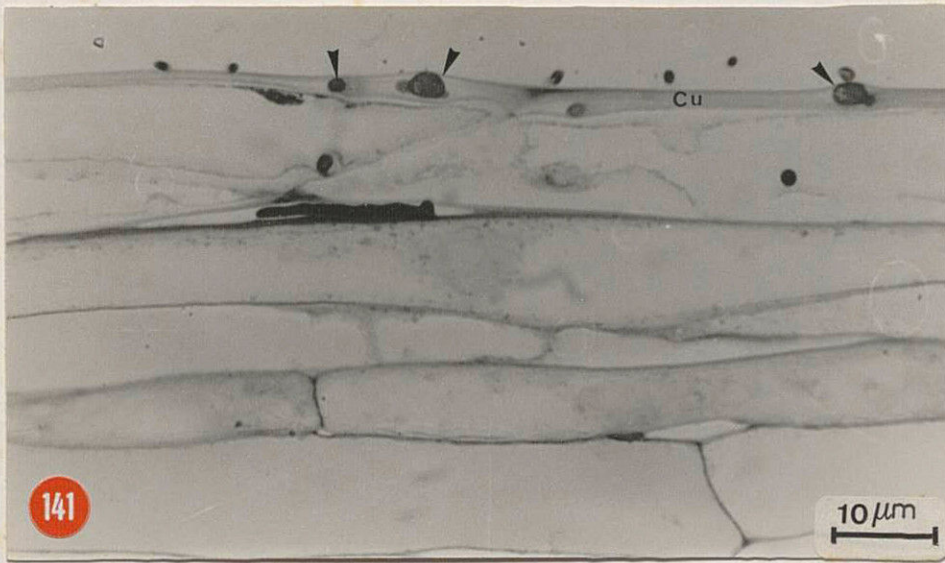
Fig. 147 : Aspect de l'infection d'un hôte résistant par *Ascochyta pisi*. L'hyphes (hy) sous-cuticulaire (►) est moins volumineux que chez l'hôte sensible; le champignon y est également plus rare

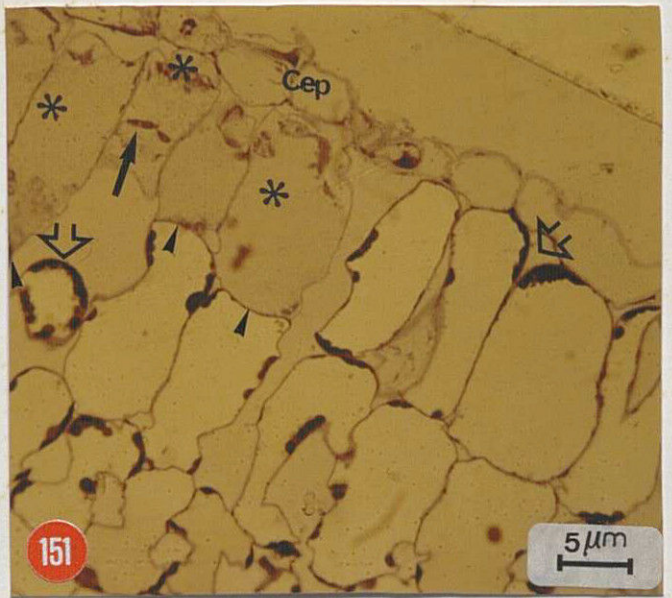
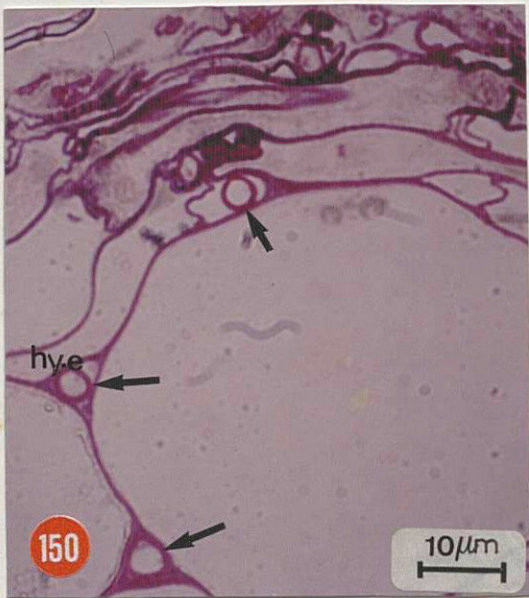
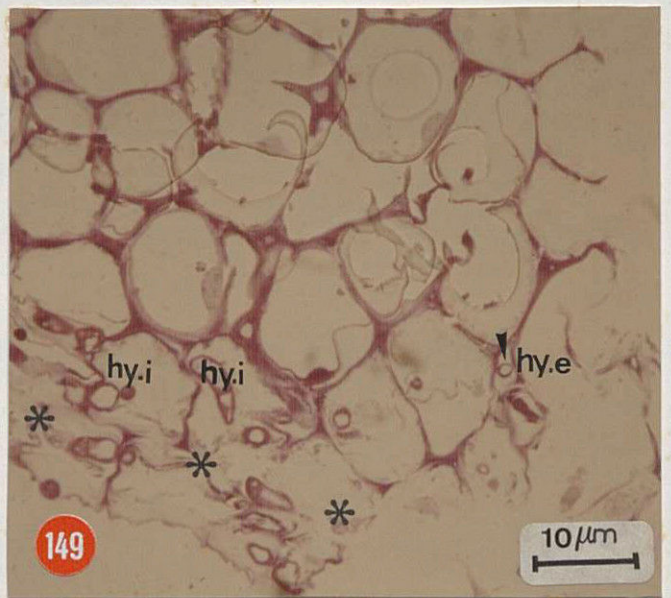
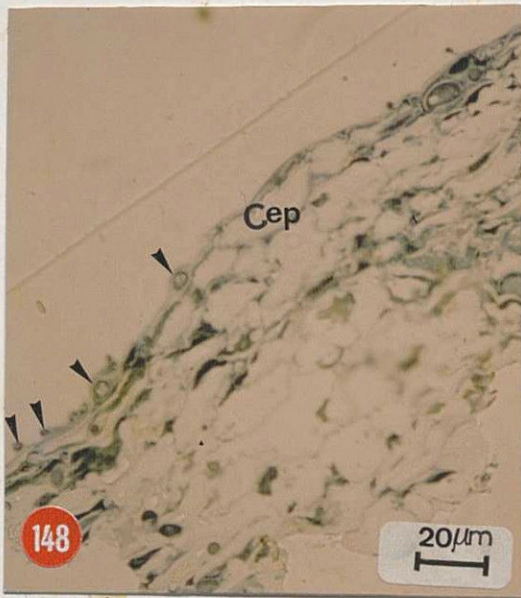
fig. 148 : Coupe transversale d'une foliole sensible de Pois, montrant l'aspect général de la colonisation superficielle de l'hôte; la plupart des hyphes sont sous-cuticulaires. Dès ce stade la formation de la nécrose est initiée.

Fig. 149 : Coupe paradermale montrant une colonisation importante des folioles de l'hôte sensible. On observe de nombreux hyphes intracellulaires (hy.i) et intercellulaires (hy.e) comme l'indique la flèche (►). Au niveau des cellules détruites (*), les limites cellulaires ne sont plus identifiables.

Fig. 150 : Coupe transversale montrant une colonisation de l'épicotyle d'un hôte sensible par des hyphes intercellulaires (hy.e) (►►).

Fig. 151 : Coupe transversale d'une foliole d'un hôte résistant. La colonisation par les hyphes (►) reste faible et superficielle. Les chloroplastes se réorientent (↗) au niveau du front de croissance des hyphes (►). Noter qu'au niveau de la nécrose (*) les limites cellulaires persistent.





ramification latérale n'est pas montré (Fig. 147).

Des observations réalisées ultérieurement, peu avant la formation de la nécrose au niveau des différents types d'organes, permettent de constater une forte colonisation superficielle des tissus de l'hôte sensible (Figs 148 et 149). Le champignon gagne ensuite rapidement les tissus plus profonds en empruntant les méats (Fig. 150). Par contre, chez l'hôte résistant la colonisation reste très superficielle, avec un nombre d'hyphes nettement plus réduit (Fig. 151).

3.6.3. MODIFICATIONS ULTRASTRUCTURALES DE L'HOTE

L'expérimentation réalisée sur les folioles et les épicotyles de Pois inoculés par *A. pisii*, a permis de suivre les changements cytologiques qui accompagnent le processus infectieux. Par des observations faites à des temps croissants (24h, 48h et 5 jours) sur des couples compatibles (Merveille de Kelvedon et Douce de Provence) et incompatibles (Rondo et Finale), il a été possible de préciser les conséquences de la présence du pathogène sur l'hôte.

3.6.3.1. APPARITION DE STRUCTURES NOUVELLES

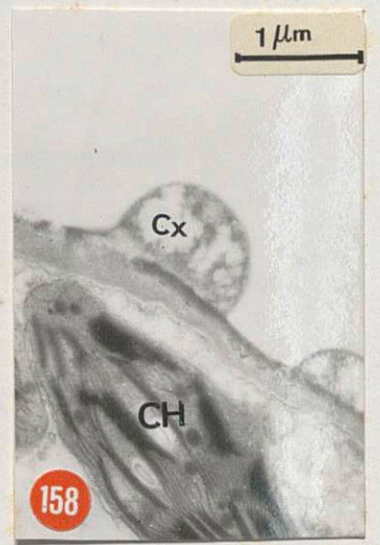
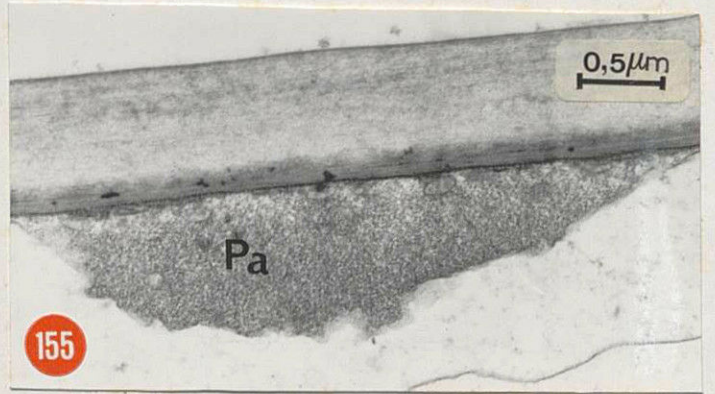
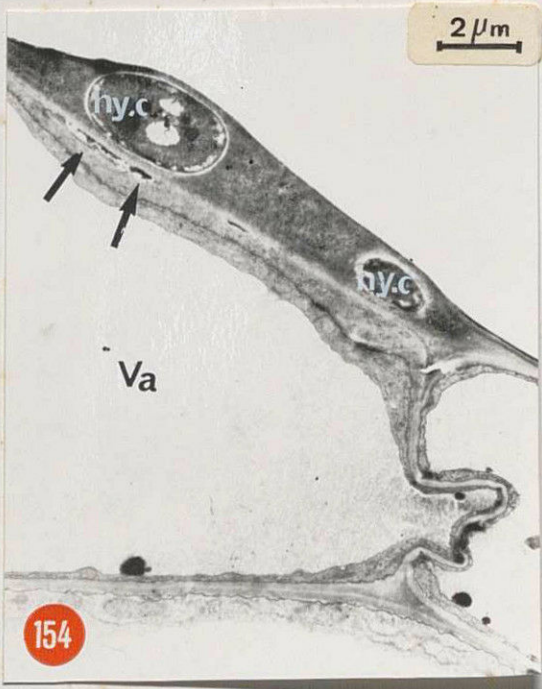
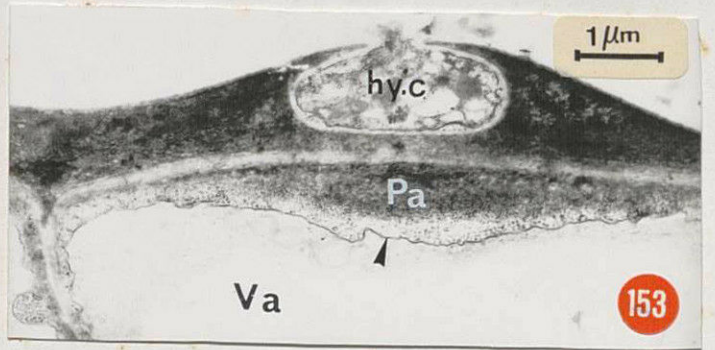
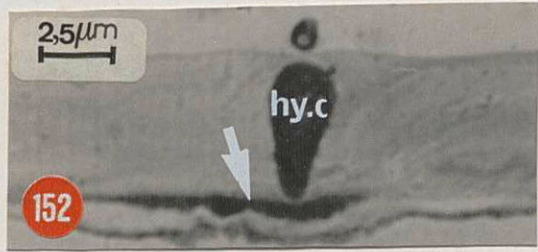
Indépendamment du niveau de compatibilité de l'hôte avec le pathogène, la pénétration du champignon dans les tissus de l'hôte est suivie par l'apparition, à proximité immédiate de l'hyphe, de certaines structures appelées communément papilles (Figs 152 à 155). Il s'agit d'un dépôt dense aux électrons localisé entre la paroi des cellules et le plasmalemme, en face des hyphes.

Fig. 152 : Aspect au microscope photonique d'un hyphe sous-cuticulaire (hy.c) ayant fortement augmenté de volume après la pénétration. La plante réagit par l'accumulation d'un dépôt (flèche blanche).

Figs 153 et 154 : Aspect ultrastructural de la réaction de l'hôte résistant à la pénétration fongique avec accumulation d'un dépôt dense aux électrons en opposition au champignon.

Fig. 155 : Aspect d'une papille (Pa) correspondant à un dépôt dense aux électrons observés chez l'hôte résistant au voisinage immédiat de la pénétration du champignon.

Figs 156 à 158 : Aspect des corps X (Cx), dépôts semi-sphériques denses aux électrons, accumulés contre les parois de l'hôte sensible. A ce stade (48 h après l'infection), les chloroplastes ont subi une modification de leur structure. (Fig. 156 et 158).



Simultanément, dans les cellules avoisinantes, apparemment saines, non envahies par le pathogène, le dépôt de composés osmiophiles est fréquemment observé (Figs 156 à 158). Ils sont généralement accolés à l'extérieur des parois, dans les espaces intercellulaires; ces corps de forme hémisphérique (Corps X) sont le plus souvent observés chez les cultivars sensibles. Après 72 h d'incubation et notamment lors de l'initiation de la nécrose, d'autres types de composés osmiophiles amorphes s'accumulent abondamment dans les espaces intercellulaires. Leur volume est plus important chez les cultivars sensibles et ont tendance à remplir les espaces intercellulaires (Figs 159 et 160).

Au même stade de développement du pathogène, chez les cultivars résistants, les mêmes types de dépôts existent mais en quantité nettement plus faible. Ils restent localisés principalement dans les angles des espaces intercellulaires (Figs 161 à 163).

3.6.3.2. ACTION DU PATHOGENE SUR L'ULTRASTRUCTURE DE L'HOTE

Comme pour les précédentes manifestations des différences assez importantes caractérisent le comportement des cultivars résistants par rapport aux sensibles. Dans de nombreux cas, les cellules des cultivars sensibles montrent à partir de 48 h d'incubation, certaines altérations de leur système membranaire. Ainsi la membrane plasmique et le tonoplaste, sont les premiers signes de dégénérescence (Fig. 164). A un stade un peu plus avancé, il y a un début de rupture de ces membranes (Fig. 165). Ultérieurement, ces modifications aboutissent à une désorganisation générale de la structure cellulaire, plus importante chez l'hôte sensible.

Figs 159 à 162 : Précipités denses aux électrons (Do) accumulés dans les méats (me) cellulaires de l'hôte sensible. La destruction des chloroplastes (CH) peut être observée (Fig. 160).

Fig. 163 : Aspect des mêmes dépôts chez l'hôte résistant. Dans ce cas, leur accumulation, essentiellement dans les angles des cellules (➤), est nettement moins importante.

Fig. 164 : Action de l'*Ascochyta pisi* sur le système membranaire de l'hôte sensible. La rupture du tonoplaste (➡) est observée en plusieurs endroits.

Figs 165 et 166 : Comportement intracellulaire (hy.i) et intercellulaire (hy.e) de l'*Ascochyta pisi* dans les tissus de l'hôte sensible. Les hyphes sont relativement turgescentes et les cellules de l'hôte bien nécrosées.

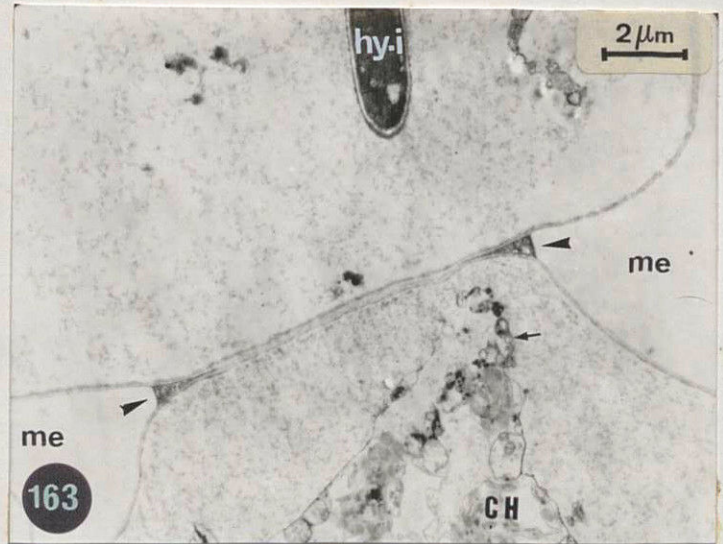
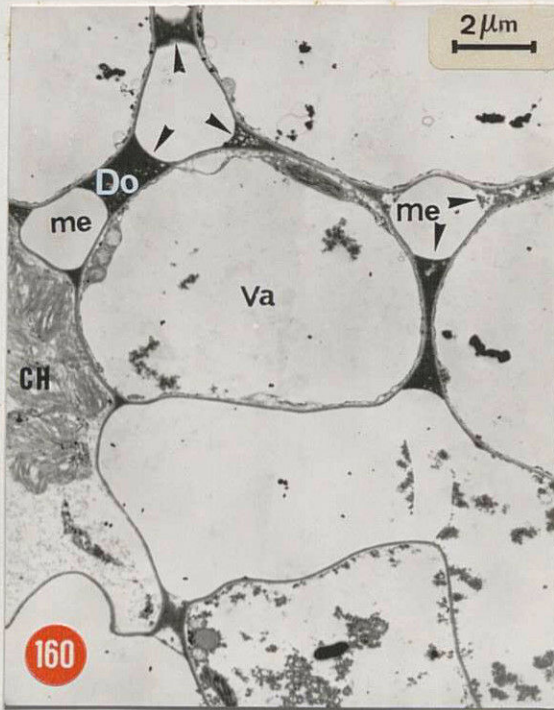
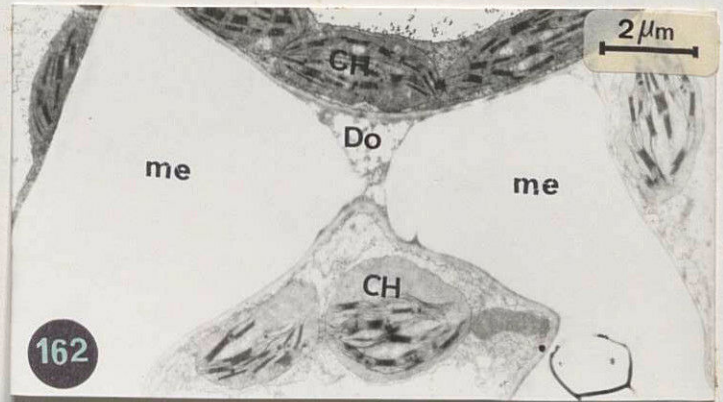
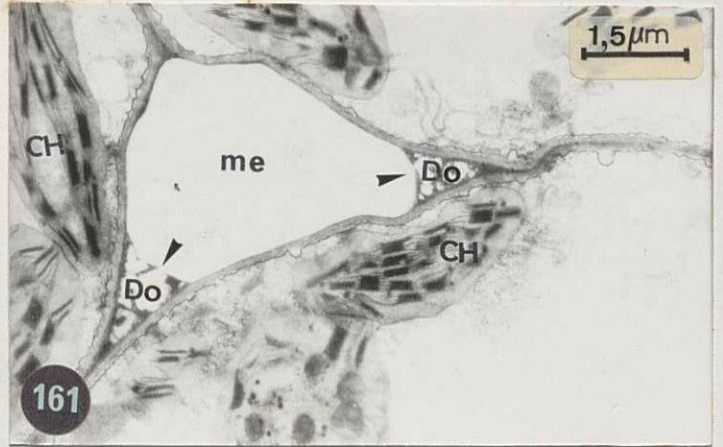
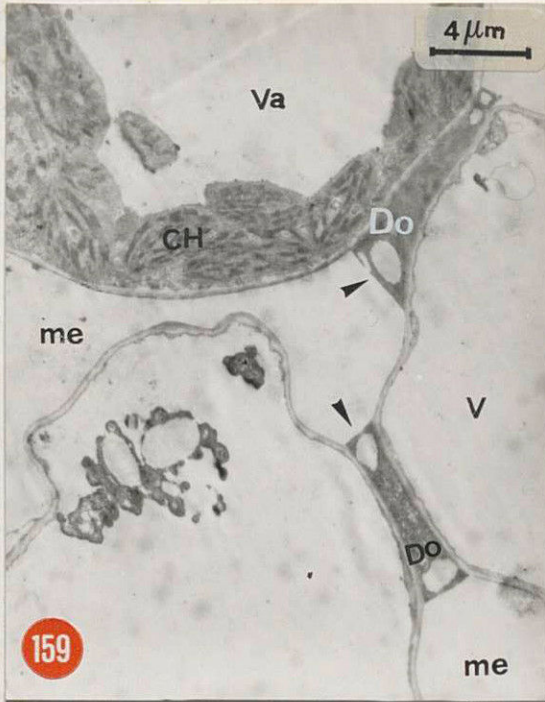
Fig. 167 : Comportement de l'hôte résistant 5 jours après l'infection. Les parois cellulaires (➔) sont toujours en place mais les chloroplastes sont détruits. Les hyphes intracellulaires (hy.i) présentent un contraste accentué et un volume réduit.

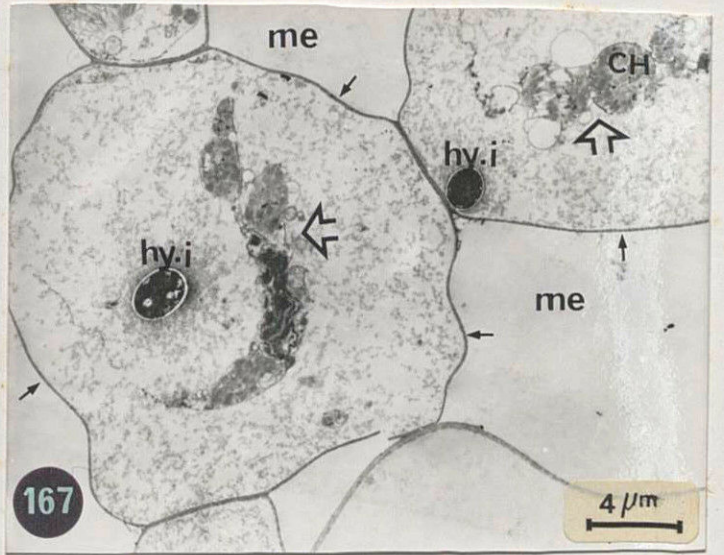
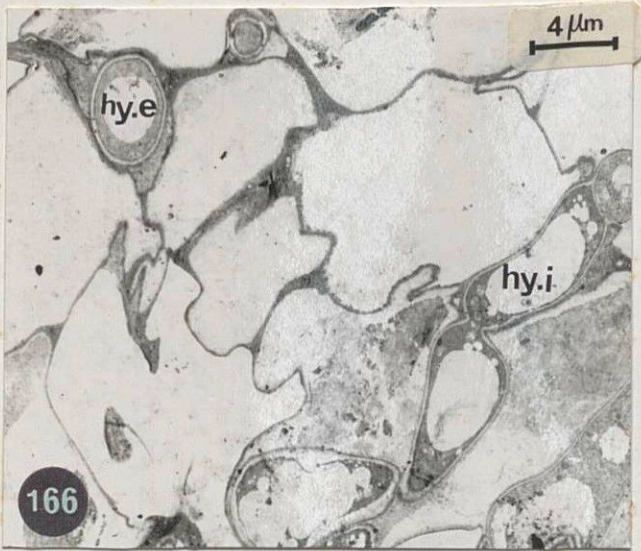
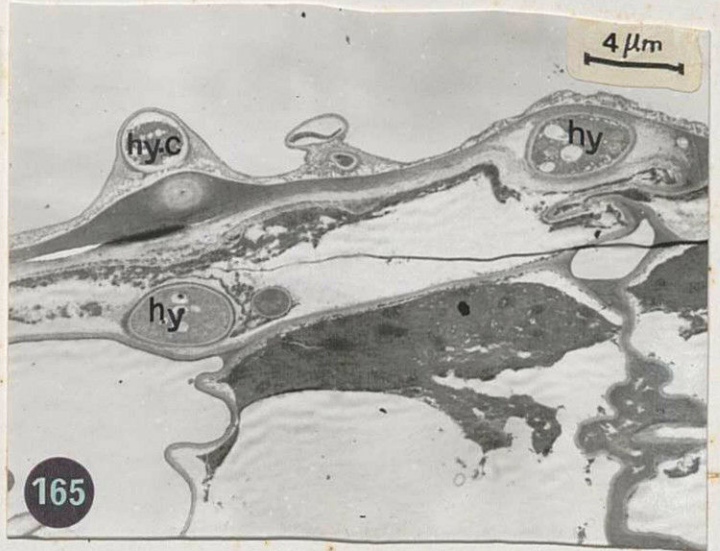
Figs 168 et 169 : Modifications subies par les chloroplastes (CH) de l'hôte sensible, 24 h et 48 h après inoculation. Noter les excroissances terminales ou latérales (➡).

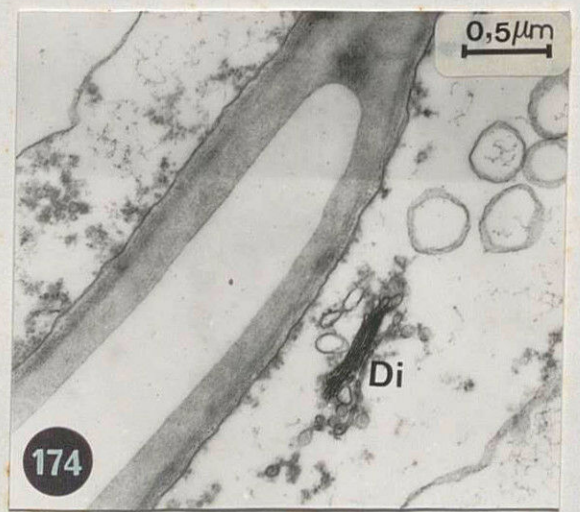
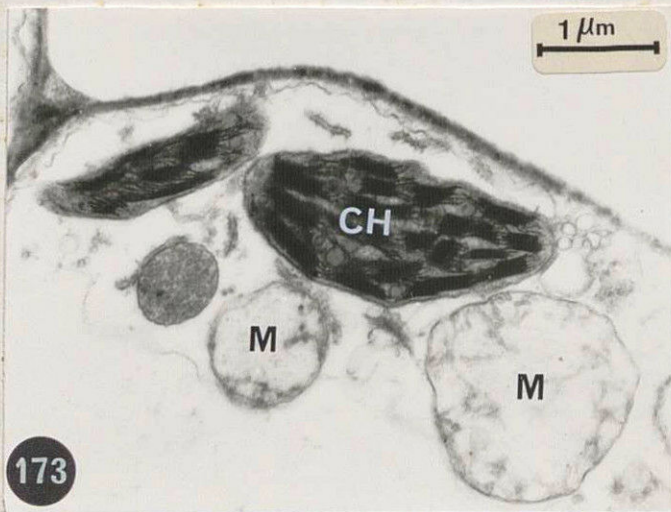
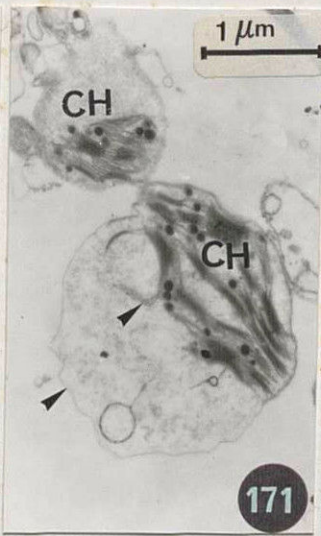
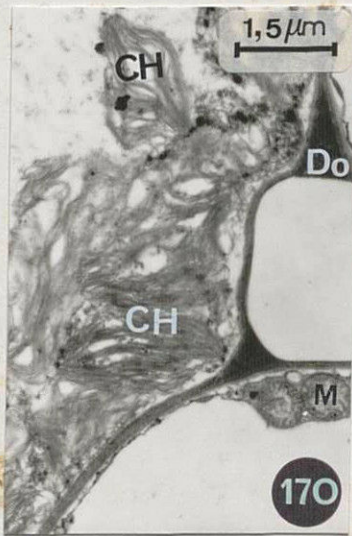
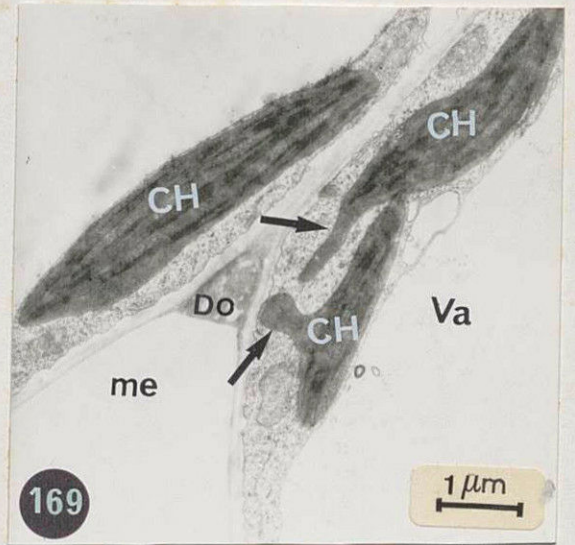
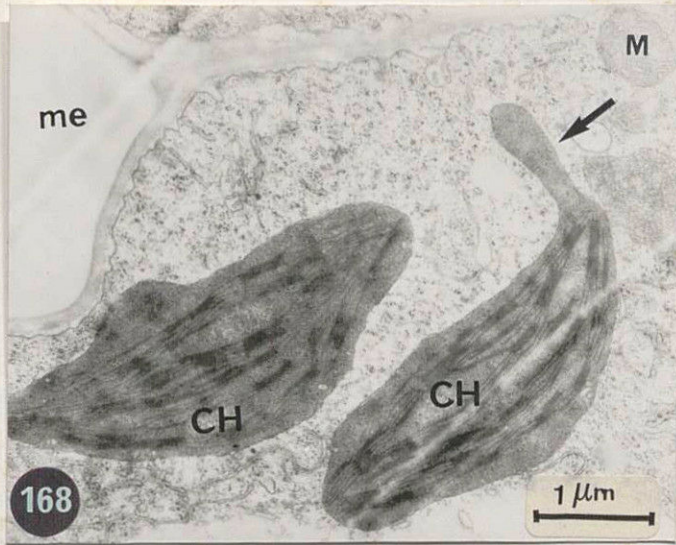
Fig 170 et 171 : Destruction des chloroplastes 72h après inoculation (➤).

Fig. 172 : Aspect général en microscopie photonique des chloroplastes chez l'hôte résistant. Ces organites sont normalement répartis dans les cellules de la zone saine (★), regroupés au niveau du front de la nécrose (➤) et absents dans la zone nécrotique (*). Faible colonisation par les hyphes (➔).

Figs 173 et 174 : Aspect ultrastructural des organites chez l'hôte résistant. L'action du champignon est moins prononcée que chez l'hôte sensible : chloroplastes (CH) avec membrane plastidiale irrégulière, dissolution et hypertrophie des crêtes mitochondriales comme le montre la figure 173. La figure 174 montre des dictyosomes plus contrastés que d'habitude.







La colonisation par le champignon s'effectue alors de manière intercellulaire et intra cellulaire (Fig. 166). En revanche ces phénomènes d'altérations sont retardés dans le cas du phénotype résistant; ce dernier maintient plus longtemps l'intégrité structurale des parois cellulaires, même si le contenu cytoplasmique est détruit, et la présence du champignon couramment observée à l'intérieur des cellules de l'hôte (Fig. 167).

Parallèlement à l'altération des différentes membranes, les autres constituants de la cellule et, en particulier, les chloroplastes sont les plus touchés durant l'installation du pathogène. Initialement allongés et ovoïdes (cf. Fig. 135), après 24 h à 48 h d'incubation, il deviennent plus ou moins sphériques ou forment des excroissances leur conférant un polymorphisme important (Figs 168 et 169). Très généralement l'organisation interne de ces organites montre de profondes altérations. On observe notamment des dilatations au niveau des thylakoïdes (Figs 170 et 171). Généralement, chez l'hôte sensible, après 72 h d'incubation, la désorganisation des chloroplastes s'accroît jusqu'à la rupture de la membrane, entraînant une destruction totale de ces organites.

Par contre, ces altérations sont moins marquées chez le cultivar résistant. En effet, à un même stade d'évolution du pathogène dans les tissus, la structure des chloroplastes est moins modifiée (Fig. 173). Cependant à proximité du front de croissance du champignon, on assiste à un regroupement des chloroplastes caractéristique (Fig. 172).

Au niveau des autres organites cellulaires ces altérations sont généralement beaucoup moins perceptibles. Cependant, il est observé une hypertrophie des mitochondries avec disparition des crêtes et éclaircissement du stroma (Fig. 173). Dans certains cas, les dictyosomes présentent un contraste accentué dans les tissus parasités (Fig. 174). Enfin, en dehors des tissus nécrotiques, les noyaux sont les organites dont la structure est la moins modifiée par la présence du pathogène.

3.6.4. MODIFICATIONS ULTRASTRUCTURALES SUBIES PAR LE PATHOGENE

Comme pour les cellules de l'hôte, l'examen en M.E.T. du champignon permet de montrer que les hyphes subissent des modifications importantes. Celles-ci varient avec le stade évolutif du pathogène dans les tissus de l'hôte attaqués et avec le niveau de résistance des cultivars. Ainsi le champignon progressant de façon intercellulaire ou intracellulaire dans les tissus d'un cultivar sensible (cf. § 3.6.3.2), est caractérisé par des hyphes à cytoplasme relativement dense et riche en organites cellulaires (Figs 175 à 178).

Par contre, au même stade d'évolution de la nécrose, un état de dégénérescence assez prononcé du champignon est observé au niveau de l'hôte résistant. On note très souvent une augmentation du volume des hyphes, une forte vacuolisation et la présence de volumineux globules denses aux électrons (Figs 179 et 180). Dans certains cas, les hyphes montrent aussi d'autres signes qui illustrent la difficulté du champignon à croître à l'intérieur des cellules

de l'hôte résistant. Il s'agit notamment de ramifications importantes subies par les hyphes du pathogènes (Fig. 180). Comme autre différence de comportement du champignon dans les tissus, un mucilage est habituellement présent autour de la paroi des hyphes dans le cas d'interactions compatibles (Fig. 178). Celui-ci est soit fortement réduit, soit absent au niveau des hyphes progressant dans les tissus de l'hôte résistant. La disparition de cette couche protectrice dans l'interaction incompatible pourrait augmenter la vulnérabilité du champignon.

3.6.5. DISCUSSION

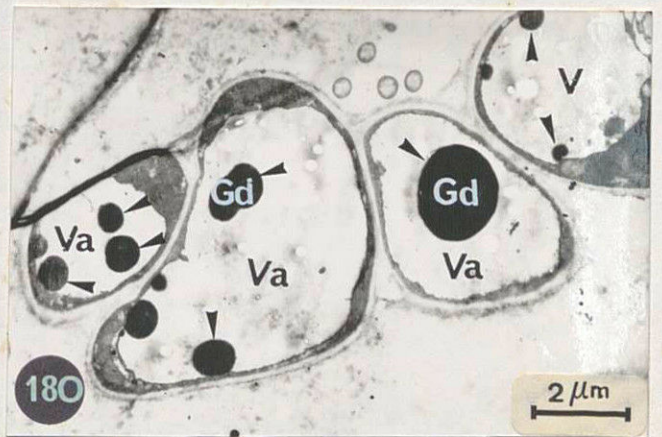
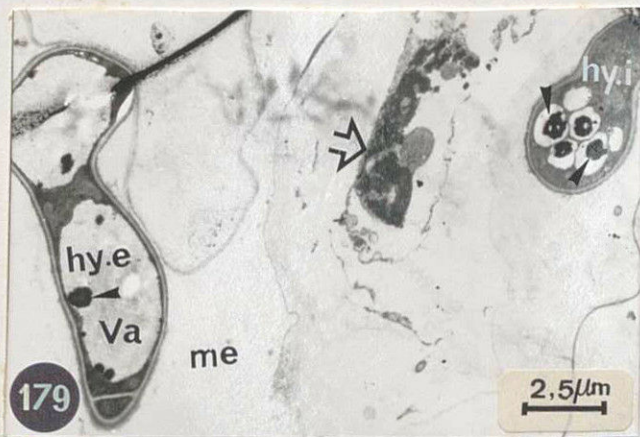
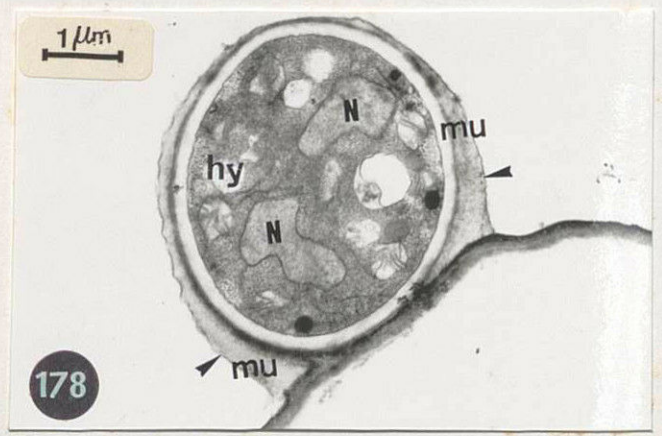
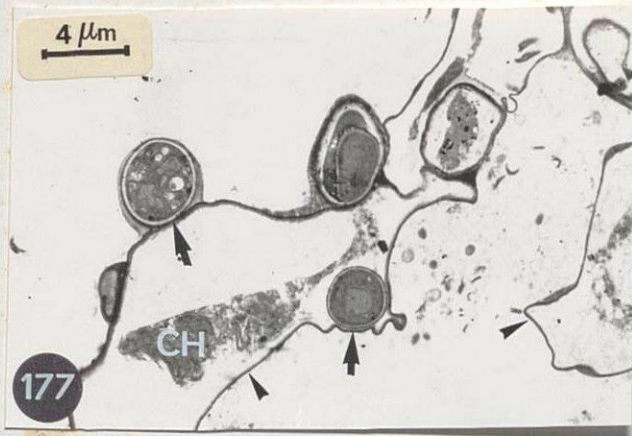
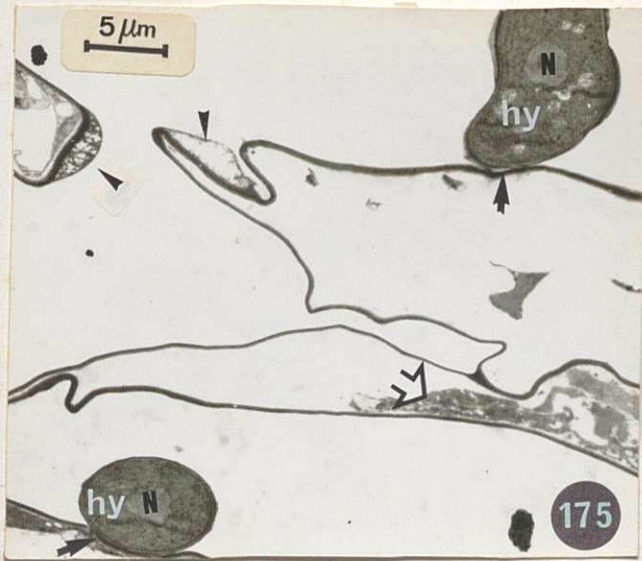
Les premiers stades de la pénétration du Pois infecté par *A. pisii* et la progression ultérieure du champignon dans les tissus du Pois, ont été étudiés pour la première fois simultanément en microscopie photonique et électronique pour élucider les rapports entre compatibilité et incompatibilité.

Cette approche a permis de préciser quelques aspects fondamentaux des mécanismes ultrastructuraux de la sensibilité et de la résistance du Pois à l'un des agents les plus importants de l'antracnose de cette culture.

Tout d'abord, et indépendamment de la nature génétique de l'hôte, la présence des cires cuticulaires observée sous forme de microvillosités en M. E. T. confirme nos résultats obtenus en M. E. B. et ceux de HALLAM et JUNIPER (1971).

Figs 175 à 178 : Comportement du champignon dans les tissus de l'hôte sensible.
Généralement les hyphes sont accolés contre les parois de l'hôte (→) par un mucilage (Fig.178). Les hyphes ont un cytoplasme dense avec organites facilement identifiables .

Figs. 179 et 180 : Comportement du champignon dans les tissus de l'hôte résistant .
Les hyphes sont généralement fortement vacuolisés (Va), avec accumulation de globules denses aux électrons (Gd) .



Quel que soit l'organe considéré, la couche supérieure de l'épiderme d'une plante est généralement représentées successivement de l'extérieur vers l'intérieur, par les cires épicuticulaires, la cuticule et la paroi pectocellulosique (VAN DEN EDEN et LINSKENS, 1974; CUTTER, 1976; JEFFREY et al., 1976). Généralement la cuticule présente une organisation ultrastructurale lamellaire ou amorphe (MAC NAMARA et DICKINSON, 1981; CALLOW, 1983). Dans les deux cas, elle est constituée de deux couches morphologiques distinctes et d'épaisseur inégale.

Dans notre cas, cette différence d'organisation de la paroi épidermique tout entière, est régie par le génotype du cultivar. Pour les deux cultivars, la distinction entre la cuticule et la paroi pecto-cellulosique est surtout déterminée par l'existence d'un contraste entre les deux couches; la cuticule apparaît nettement plus mince. La disposition très compacte des microfibrilles observée dans la cuticule des cultivars type Finale accentue cette différence. Par contre, le cultivar type Merveille de Kelvedon présente des couches plutôt amorphes et moins denses aux électrons.

Comme l'ont indiqué récemment CONTI et al., (1985) à propos du comportement de deux cultivars de rosiers parasités par *Sphaerotheca pannosa*, le réseau dense que forment les cires cuticulaires à la surface des folioles, et l'épaisseur même de la cuticule constitueraient la première barrière mécanique rencontrée par *A. pisii* durant la pénétration de la paroi épidermique du Pois.

De même, les modalités de pénétration directe à travers la cuticule de l'hôte, comme suggérées précédemment sur la base des observations en M.E.B., semblent

se confirmer au moins pour le cultivar sensible. L'enfoncement des parois des cellules épidermiques souvent considéré comme un critère de pénétration mécanique (Mc KEEN, 1974; WHEELER, 1975) est en partie vérifié. Il reste que dans certains cas, la pénétration de la couche épidermique a lieu en ne subissant aucune action apparente. Dans ces conditions, il n'est pas exclu comme l'ont indiqué beaucoup d'auteurs à propos d'autres interactions hôte-parasite (Mc KEEN et RIMMER, 1973; DEFOSSE et DEKEGEL, 1974; BISHOP et COOPER, 1983; O'CONNELL et al., 1985), que la pénétration ne soit pas essentiellement mécanique ou enzymatique, mais qu'elle fasse appel à ces deux types d'actions.

En ce qui concerne les événements intervenus immédiatement après la pénétration, les observations obtenues en microscopie photonique et microscopie électronique à transmission, ont mis en évidence une augmentation de taille des hyphes en position sous-cuticulaire. Ce type de comportement avait été observé précédemment en M.E.B., aussi bien pour les cultivars sensibles que pour les résistants.

La formation de ces structures est comparable aux vésicules fréquemment observées chez la plupart des champignons biotrophiques tels que les mildious, les oïdiums et les rouilles (WEHTJE et al., 1979; COFFEY et WILSON, 1983). Ces mêmes structures fongiques ont été également observées chez quelques hémibiotrophes comme le *Colletotrichum Lindemuthianum* (O'CONNELL et al., 1985; O'CONNEL et BAILEY, 1986), ou le *Pyrenophora teres* (KEON et HARAGREAVES, 1983) groupe nécrotrophique au quel est souvent rattaché *A. pisi*. Ces auteurs avaient noté une réduction significative du nombre et de la taille des vésicules chez les cultivars résistants. Leur absence dans notre cas, a probablement pour conséquence une action défavorable sur les relations trophiques que le champignon tenterait d'établir avec son hôte.

Chez les couples compatibles et à un stade plus avancé de la pénétration, des ramifications latérales plus ou moins importantes prennent souvent naissance à partir des vésicules. Elles confèrent alors à l'A. *pisi* une phase sous-cuticulaire, qu'on retrouve aussi chez les nécrotrophes comme le *Cercospora herpotrichoides* (DEFOSSE et DEKEJEL, 1974); A. *rabiei* (AMEZIANE EL HASSANI, 1981), ou chez les hemibiotrophes comme le *Colletotrichum lindemuthianum* (MERCER et al., 1975; O'CONNELL et al., 1985).

Parmi les événements ultérieurs accompagnant le processus d'infection du Pois par A. *pisi*, plusieurs types de matériels denses aux électrons, peuvent être identiques. L'accumulation de ces différentes substances est soit directement liée aux structures de pénétration, soit en relation avec la progression des hyphes à l'intérieur des tissus jusqu'à la formation de la nécrose. Dans l'une ou l'autre des situations, l'aspect morphologique et la localisation des dépôts peut varier en fonction du cultivar.

D'une manière générale, de par leur forme et leur taille très diverses et en fonction de leur lieu d'accumulation, différents termes sont employés pour désigner ces composés quelquefois amorphes. Le plus souvent ces dépôts observés entre les parois cellulaires et le plasmalemme de l'hôte et en opposition avec le champignon, correspondent aux appositions pariétales largement décrites (DEVERAL et SKIPP, 1972; ALLARD, 1974; AIST, 1976; DELON, 1975; MERCER et al., 1975; STEINKAMP, 1979; WEHTJE et al., 1979; RIDE, 1983; MILLER et MAXWELL, 1984; O'CONNELL et al., 1985).

D'autres dénominations sont utilisées pour désigner des structures moins définies: corps X, substances osmophiles, matériel extracellulaires (LAZAROVITS et HIGGINS, 1976; AMEZIANE EL HASSANI, 1981; DURAND et SALLE, 1981; SALOMON et

DOUSSINAULT, 1981). Le rôle de ces substances dans la pathogénèse est souvent corrélié avec le niveau de résistance de l'hôte (AIST, 1976; DURAND et SALLE, 1981; MILLER et MAXWELL, 1984). Dans d'autres interactions, il a été constaté que leur accumulation au niveau des cultivars sensibles et résistants peut être très variable^{et} n'avoir aucune relation avec la résistance (MC KEEN, 1974; RIDE, 1983; BISHOP et COOPER, 1983).

Dans le cas de l'interaction *P. sativum* / *A. pisii*, bien que la plupart des substances osmiophiles soient détectées à la fois chez les cultivars sensibles et résistants, des différences importantes sont constatées au cours du temps et en fonction du degré de compatibilité.

C'est ainsi que des dépôts amorphes accumulés préférentiellement dans les coins des espaces intercellulaires, sont comparables à ceux observés dans les tissus de betteraves infectés par *Cercospora beticola* (STEINKAMP et al., 1979). Ces accumulations étaient beaucoup plus importantes dans les cultivars de Pois sensibles. Ce même type de matériel extracellulaire était de taille plus réduite et faiblement dense aux électrons dans les tissus de l'hôte résistant.

En ce qui concerne les corps X, leur présence a été considérée par de nombreux auteurs comme liée à la nature de la plante hôte. De tels dépôts semi-sphériques accolés aux parois dans les espaces intercellulaires de l'hôte, ont été observés dans des cultivars résistants de tomate (*Lycopersicon esculentum*) parasités par du *Cladosporium fulvum* (LAZAROVITS et HIGGINS, 1976). DURAND et SALLE (1981) ont montré que l'accumulation de ces corps X était associée à la résistance induite des feuilles de tomate parasitées par le *Phytophthora capsici* et traitées par du Phoséthyl Al . Ce même matériel extracellulaire a été décrit par AMEZIANE EL HASSANI (1981) chez des cultivars de Pois chiches tolérants à l'*Ascochyta rabiel*.

Comparativement à ces derniers auteurs, nos résultats sont tout à fait contradictoires avec leurs conclusions, en ce sens que la présence des corps X était montrée essentiellement chez les cultivars de Pois sensibles. Par ailleurs en étudiant quelques aspects cytologiques et cytochimiques de l'interaction *P. sativum* / *Peronospora pisi*, HICKEY et COFFEY (1977 et 1978), n'ont pas signalé la formation des corps X.

Cette analyse comparative entre les champignons parasites de la Tomate et du Pois, illustre bien la complexité des aspects ultrastructuraux observés au cours de la pathogénèse, d'où l'intérêt de connaître la nature histochemique et cytochimique de certains métabolites de l'interaction hôte-parasite qui est envisagé dans la dernière partie de notre travail.

Les corrélations généralement faites entre la présence de composés extra-cellulaires denses aux électrons et la résistance ne sont pas toujours claires. Cependant leur association constante avec les tissus infectés d'une part, et leur absence dans les tissus sains d'autre part, est au moins une preuve d'une réponse générale de la plante à l'attaque fongique (Mc KEEN, 1974; RIDE, 1983). Il n'est pas impossible non plus que ces produits extracellulaires éventuellement toxiques pour l'hôte, soient secrétés directement par le champignon.

D'autres composés denses aux électrons et localisés en dehors des espaces intercellulaires de l'hôte, ont été détectés entre les parois cellulaires et le plasmalemme. Ces appositions pariétales ou papilles, ont été

observées, soit aux sites de pénétration de l'épiderme, soit au voisinage immédiat de la croissance primaire du champignon. Dans ce dernier cas, leur formation à distance par l'action de divers métabolites, telle que suggérée pour le *Colletotrichum lindemuthianum* par O'CONNELL et BAILEY (1986) est très probable. D'après les caractéristiques ultrastructurales ayant permis de distinguer plusieurs types de papilles chez l'orge parasitée par *Erysiphe graminis* f.sp. hordei (ZEYEN et BUSHNELL, 1979; HEITEFUSS et EBRAHIM NESBAT, 1986), celles observées chez le Pois infecté par *A. pisi* présentent peu de variabilité. Elles sont constituées par du matériel homogène dense aux électrons et n'alternant pas avec des couches moins opaques. De plus, leur formation chez les cultivars résistants, intervient toujours après la pénétration. Pour ces cultivars sensibles ces types de dépôts n'ont été observés que rarement en microscopie photonique.

Leur localisation le plus souvent en opposition avec le champignon dans les cellules épidermiques des cultivars résistants, pourrait confirmer le rôle qui leur est généralement attribué dans la résistance pour d'autres interactions et le plus souvent contre l'oïdium des céréales (AIST, 1976; SHERWOOD et VANCE, 1976 et 1980; ZEYEN et BUSHNELL, 1979; RIDE, 1985; O'CONNELL et al., 1985; HARGREAVES et KEON, 1986).

3.7. IDENTIFICATION HISTOCHIMIQUE ET CYTOCHIMIQUE DE QUELQUES COMPOSES ACCUMULES LORS DE L'INTERACTION ENTRE LE POIS (*Pisum sativum*) et *Ascochyta blight*

Au cours des différentes étapes de l'infection du Pois par *A. blight*, les études cytologiques ont permis de constater, à l'échelle cellulaire, l'existence de modifications ultrastructurales de l'hôte, ou encore l'apparition de nouvelles structures. Comparativement à l'hôte sain, des différences d'interactions ont été notées entre les hôtes à phénotype sensible et ceux à phénotype résistant. Pour préciser davantage la participation de ces nouvelles structures à la pathogenèse, une approche de leur nature chimique a été réalisée en cytochimie.

3.7.1. DETECTION DES COMPOSES DE NATURE CALLOSIQUE

En réponse à l'attaque des agents fongiques, la callose et les polyphénols sont souvent mis en évidence.

Afin de déceler de telles accumulations, des folioles de Pois infectées par *Ascochyta blight*, ont été colorés par le bleu d'aniline à pH basique puis observés en lumière U.V. (518 nm).

Les résultats obtenus par cette technique sur des coupes pratiquées dans la zone initiale de formation de la nécrose (5 jours après l'infection) montrent la présence de dépôts fluorescents (Fig. 181). L'intensité de cette fluorescence varie avec l'importance du matériel accumulé dans les cellules.

Fig. 181 : Coloration au bleu d'aniline pour la mise en évidence de la callose. La fluorescence en lumière U.V. (→ 1 et 2) indique la présence de callose au niveau des nécroses provoqués par *Ascochyta pisi*.

Fig. 182 : Aspect de ces mêmes substances observées en lumière visible. Elles apparaissent sous forme de dépôts bruns non fluorescents (→ 1 et 2).

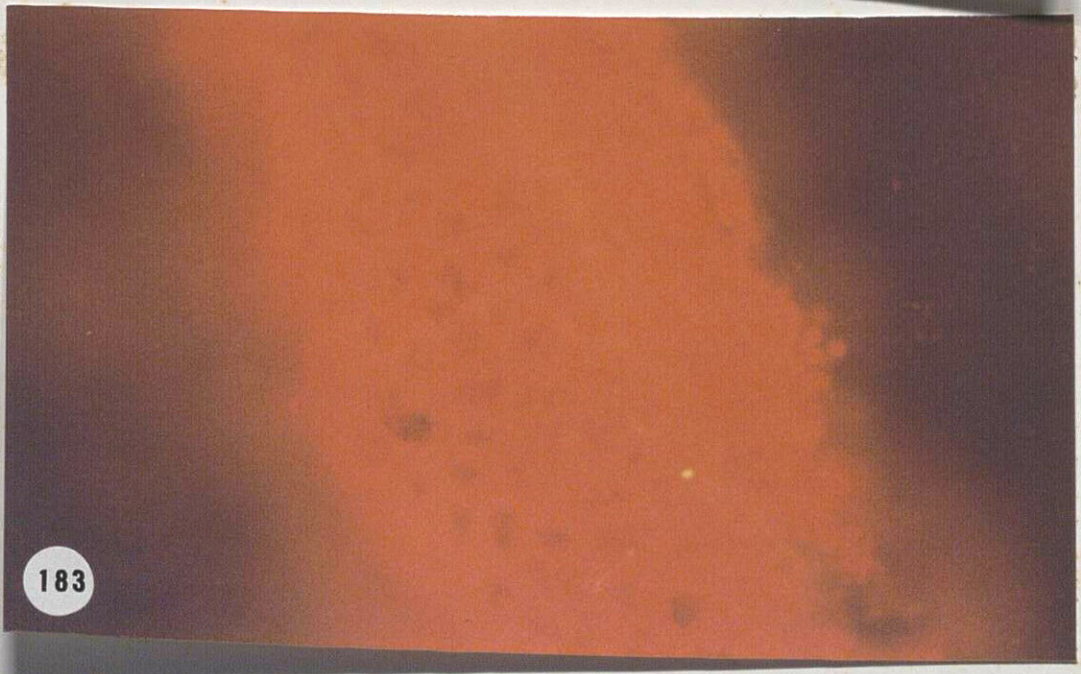
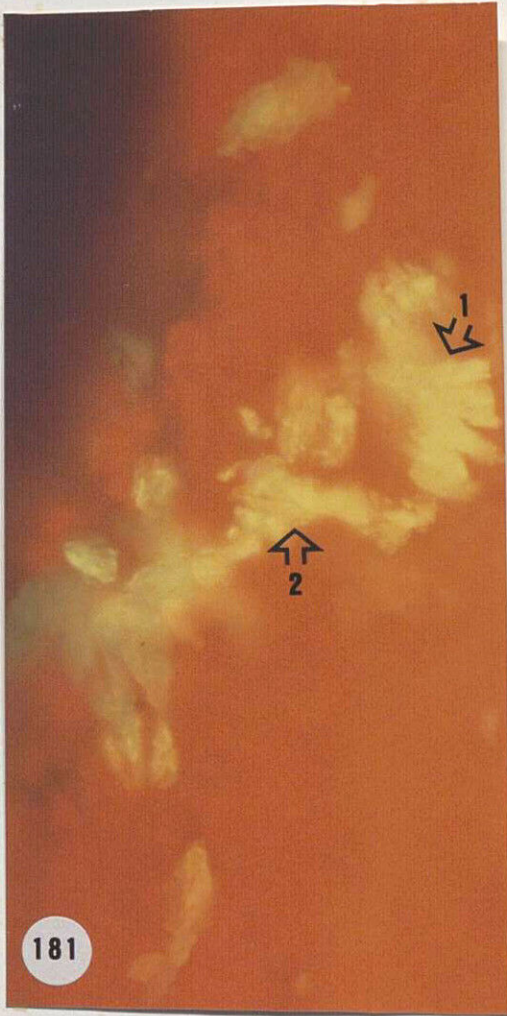
Fig. 183 : Test réalisé sur tissu sains. Aucun dépôt, ni fluorescence ne sont détectés.

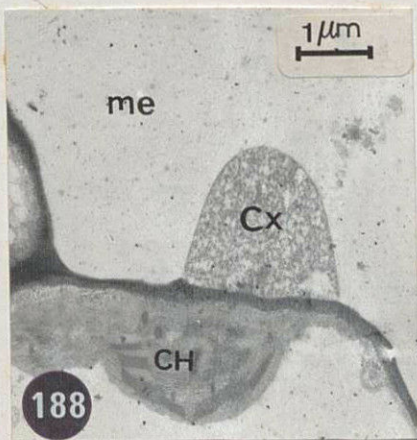
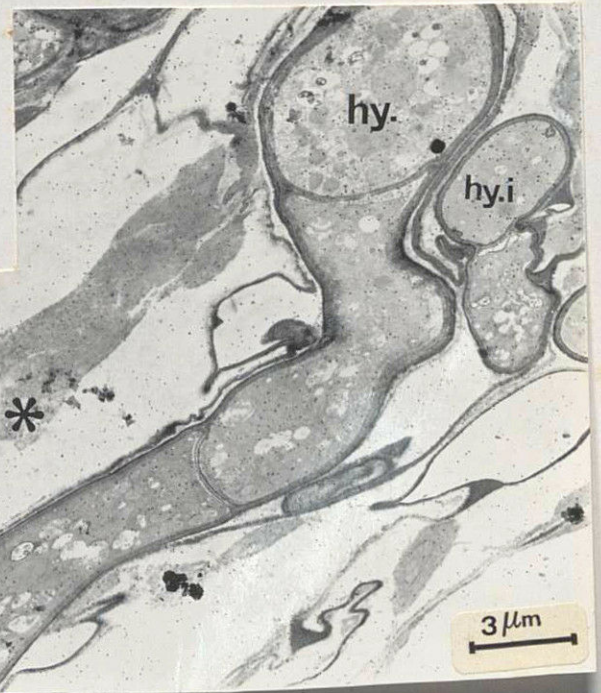
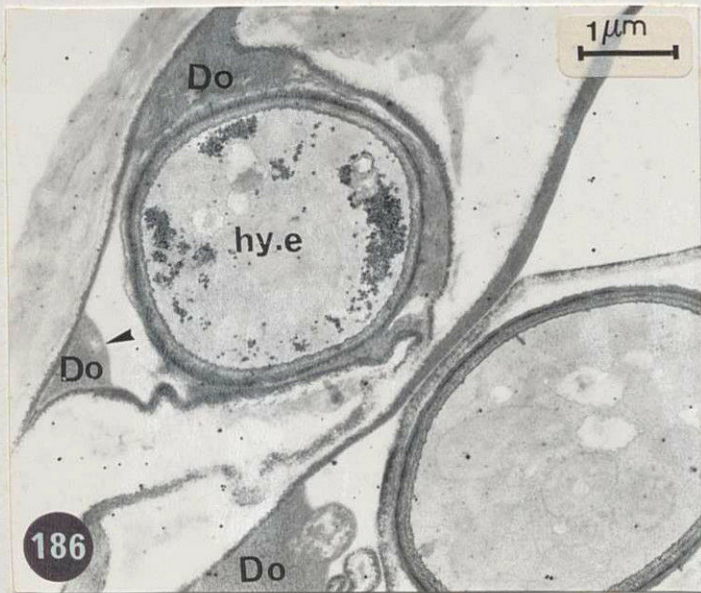
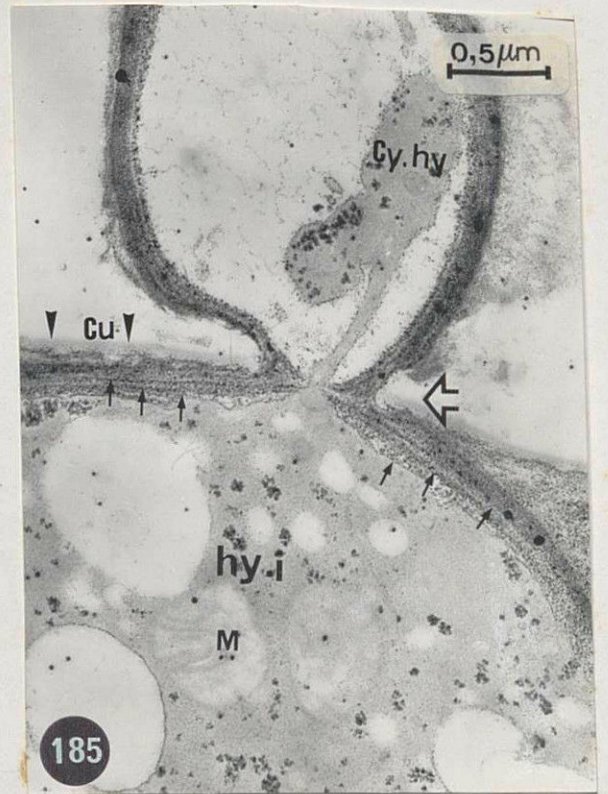
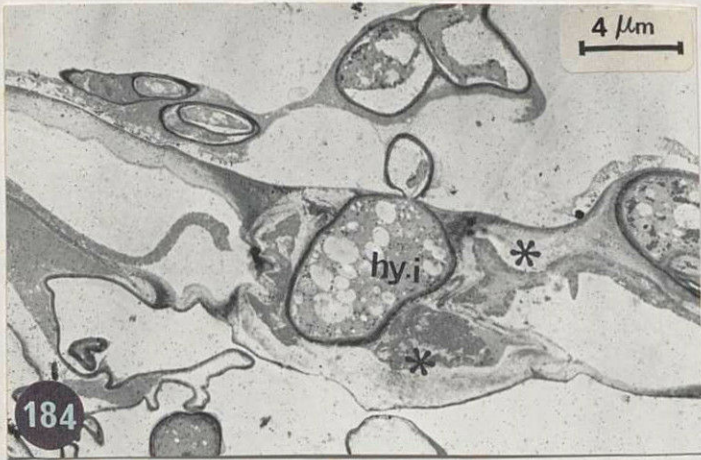
Fig. 184 : Test PATAg pour la caractérisation des composés polysaccharidiques. L'aspect général de la nécrose montre que les parois des hyphes et de l'hôte ont réagi positivement.

Fig. 185 : Détail de l'hyphe (hy.i) pénétrant à travers la cuticule (Cu), caractérisé par un étranglement (→) au point de pénétration. Le test PATAg met en évidence les différentes couches pariétales (→) du champignon.

Figs. 186 et 187 : Les dépôts denses aux électrons (Do) observés dans les angles des méats réagissent positivement au test PATAg. On note aussi une plus forte réactivité des parois du champignon par rapport à celle de l'hôte.

Fig. 188 : Les corps X (Cx) réagissent positivement à ce test.





Ces résultats positifs à un test considéré comme spécifique, témoignent de la nature callosique de ces dépôts. Ces mêmes composés observés en lumière visible, se présentent sous forme d'amas denses de couleur brune (Fig. 182); avec les composés phénoliques, ils sont en partie responsables du brunissement de la nécrose. Par contre quelle que soit la technique d'observation utilisée, aucune substance de ce type n'est détectée dans les tissus non infectés (Fig. 183).

Enfin, il faut préciser que l'accumulation des substances callosiques intervient tardivement au cours du processus infectieux. De telles colorations réalisées sur des fragments d'épidermes, où les sites de dépôts peuvent être localisés dès les premiers stades de l'infection (< 48 h), ont été négatives.

3.7.2. DETECTION DES POLYSACCHARIDES

Comme la callose, d'autres substances de nature polysaccharidique peuvent être impliquées dans les interactions hôte-parasite. Leur détection cytochimique a été envisagée par nombre de phytopathologistes, pour comprendre les mécanismes du processus infectieux chez les plantes.

Les travaux entrepris sur le couple *Pisum sativum*/ *Ascochyta pisi* sont illustrés par les figures 184 à 188. D'une manière générale, les parois de la plante-hôte et celle du champignon réagissent très positivement au test des polysaccharides. C'est un premier indice qui nous a permis de juger de la fiabilité de la technique elle-même. Les figures 184 à 186 montrent que les parois fongiques sont plus contrastées que celles de l'hôte. Ces figures mettent en évidence une structure en feuillet de la paroi du champignon. Au niveau de la figure 185, il convient de noter

l'étranglement du champignon lors de la pénétration ainsi que le passage progressif du contenu cytoplasmique de l'hyphe extérieur vers celui de la vésicule sous-épidermique.

L'application du test PATAg permet également de préciser la nature cytochimique de certains composés précédemment observés en M.E.T. (Cf. Figs 159 à 163). Ils s'agit des substances denses aux électrons qui sont localisés dans les angles des espaces intercellulaires envahis par le champignon (Figs 186 et 187) et des composés type corps X, plaqués contre les parois des cellules de l'hôte (Fig. 188). Les premières (Fig. 186) réagissent plus fortement au PATAg que les secondes (Fig. 188).

3.7.3. MISE EN EVIDENCE DE QUELQUES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Deux principales catégories d'enzymes sont impliquées lors de l'attaque des plantes par les champignons. D'une part, les enzymes élaborées par l'agent pathogène qui lui permettent de progresser dans les tissus en dégradant les parois et les contenus cellulaires de l'hôte et d'autre part, les enzymes produites par l'hôte qui interviennent dans le métabolisme général de la plante en réponse à l'agression.

Dans cette dernière partie de nos recherches une tentative a été faite pour identifier et localiser cytochimiquement quelques unes de ces enzymes, le rôle des enzymes pectinolytiques étudié par HEATH et WOOD (1971) ayant été considéré comme relativement mieux connus.

- DETECTION DE LA PHOSPHATASE ACIDE

Après incubation dans une solution de β -glycérophosphate des tissus de Pois attaqués par *A. pisii*, d'importants

Figs 189 à 191 : Mise en évidence de la phosphatase acide dans les méats (me) et autour des hyphes (hy.e). Les précipités de plomb (►) indiquent la présence de l'enzyme.

Fig. 192 : Activité de la phosphatase acide le long des parois cellulaires (►) de l'hôte .

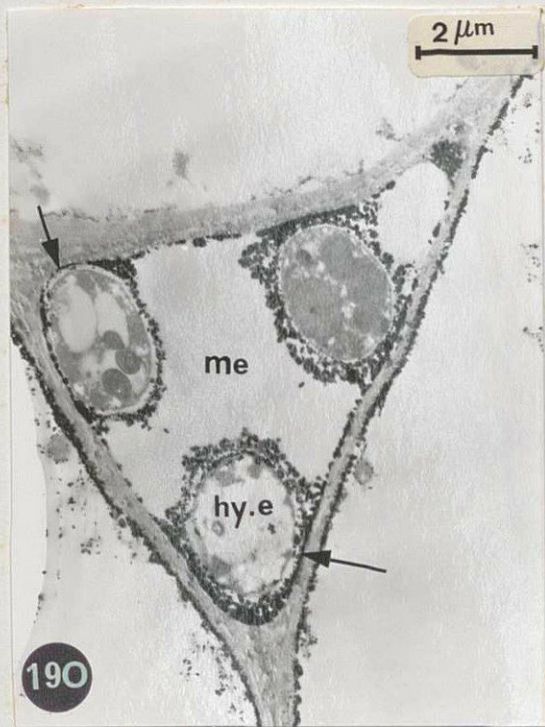
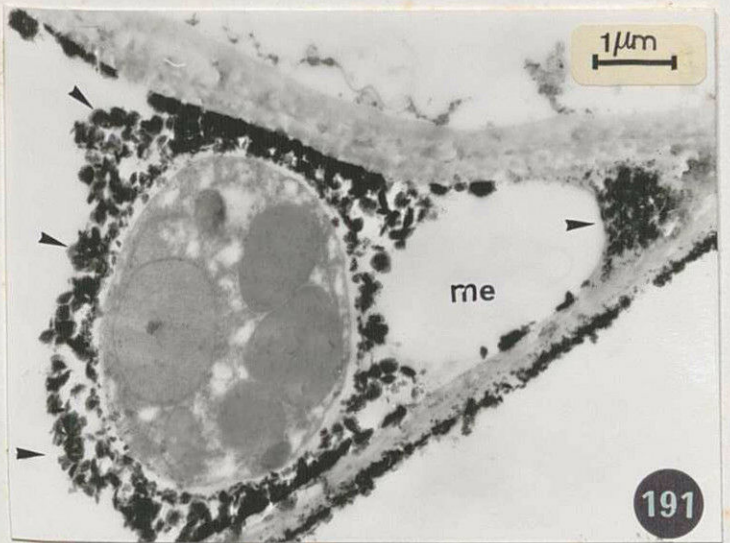
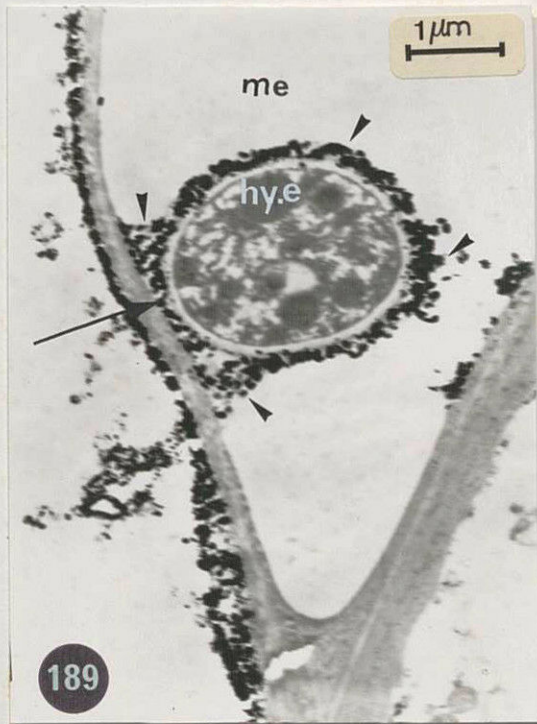
Fig. 193 : Réaction témoin sans incubation dans le substrat. Aucune activité n'est détectée ni au niveau des tissus de l'hôte, ni à proximité du champignon.

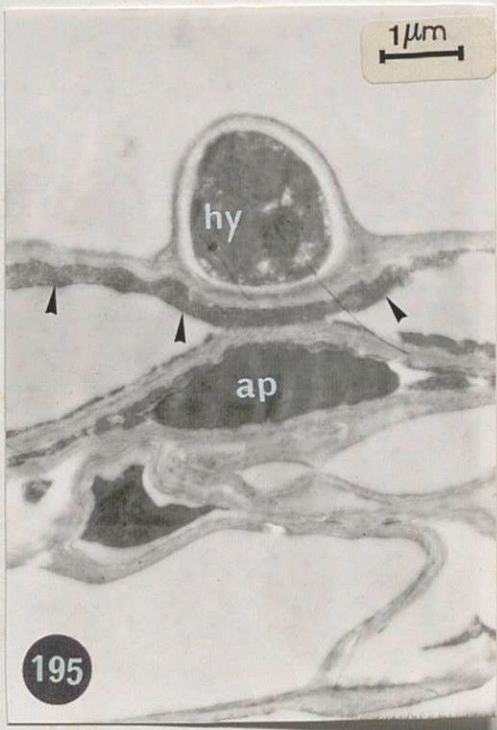
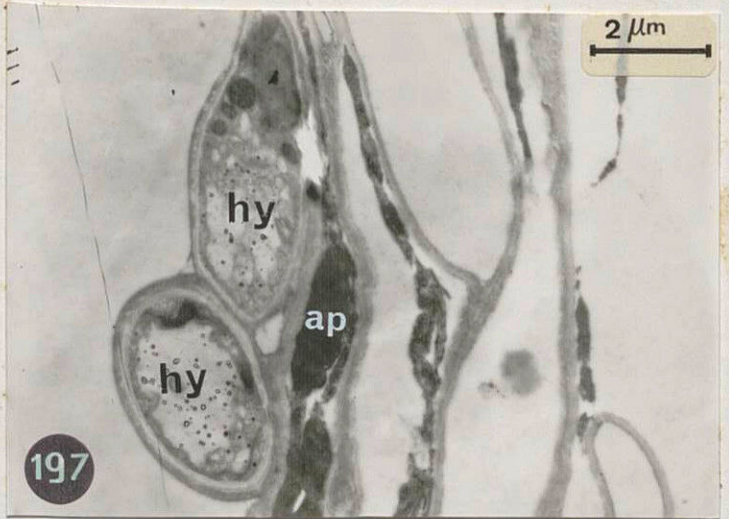
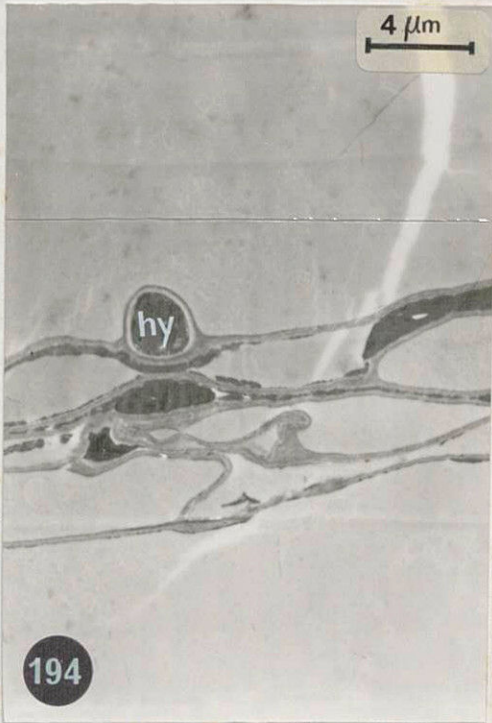
Fig. 194 : Aspect général de la réaction des tissus de Pois infectés par *Ascochyta pisi* au test de mise en évidence de la polyphénoloxydase (D.O.P.A.).

Fig. 195 : Détail des dépôts ayant réagi à la D.O.P.A. Les uns sous forme d'une bande le long des parois de l'hôte, la réaction est plus intense au voisinage immédiat du champignon. Les autres localisés en apposition avec l'hyphe (ap). Ce dernier dépôt correspond à ce qui est habituellement décrit sous la dénomination de papille.

Fig. 196 et 197 : Aspect de ce test dans une autre zone de la nécrose (*). La présence de dépôt (ap) face à deux hyphes confirme les observations précédentes relatives aux papilles.

Fig. 198 : Les dépôts généralement observés dans des angles des méats réagissent négativement à la D.O.P.A





précipités denses aux électrons sont observés principalement autour des hyphes et dans les méats (Figs 189 à 192). En ce qui concerne les cellules de l'hôte, leur niveau de réactivité est semblable dans les tissus sains et parasités. Les tissus témoins n'ayant pas subi d'incubation dans le substrat de l'enzyme recherchée (Fig. 193), ne présentent pas de tels précipités.

Ces observations démontrent l'intervention de la phosphatase acide dans le processus d'infection. La localisation des précipités, suggère que cette enzyme hydrolytique, liée à la présence du champignon, doit être sécrétée par le champignon.

- DETECTION DE LA POLYPHENOLOXYDASE

Les résultats obtenus sur la localisation cytochimique de la polyphénoloxydase sont illustrés par les figures 194 à 197. L'activité polyphénoloxydasique est matérialisée par la formation d'un produit de réaction denses aux électrons se présentant sous deux aspects. Dans le premier cas, les dépôts très denses aux électrons, sont localisés entre la paroi et le plasmalemme des cellules hôtes font face aux hyphes mycéliens (Figs 195 et 197). Leur localisation rappelle les composés précédemment décrits dans l'étude ultrastructurale sous l'appellation "appositions" fongiques ou papilles (cf. Figs 151 à 155). Le deuxième type de dépôt de taille plus réduite, se présente sous la forme d'une bande osmiophile très marquée (Fig. 195) dont les limites ne sont pas toujours définies (Fig. 197). Fréquemment localisés en apposition avec les hyphes, ces dépôts représentent une barrière ayant tendance à limiter l'extension du champignon. Notons que les composés présents dans les méats et observés après contraste à l'acétate d'uranyle-citrate de plomb.

(Cf. Figs 159 à 163) ne réagissent pratiquement pas au test de mise en évidence de la polyphénoloxydase.

- DETECTION DE LA PEROXYDASE

Comparativement aux activités enzymatiques précédemment étudiées, l'activité peroxydasique a été faiblement mise en évidence. Néanmoins, les observations obtenues à partir de tissus nécrosés ayant subi un traitement par la Diaminobenzidine (DAB), substrat spécifique de la peroxydase, et un traitement par l'eau oxygénée (H_2O_2), montrent une accumulation importante d'un matériel relativement dense aux électrons. Mais le stade avancé de la nécrose, n'a pas permis d'apporter davantage de précision sur la localisation des substances de nature peroxydasique par rapport aux limites cellulaires de l'hôte.

Par contre, les tissus témoins analysés sans traitement par l'eau oxygénée (H_2O_2), ont présenté une très faible densité aux électrons. Cette différence de réaction aux deux types de traitements, peut être considérée comme une réponse positive à la recherche de cette enzyme. Cependant, il n'a pas été possible de préciser la réactivité des dépôts habituellement observés dans les espaces intercellulaires.

Enfin, pour cette dernière activité enzymatique, il est à signaler que les dépôts osmiophiles qui viennent d'être caractérisés sont comparables à ceux observés lors des tests spécifiques de la mise en évidence de la polyphénoloxydase.

3.7.4. DISCUSSION

Les recherches histochimiques et cytochimiques concernant les relations hôte-parasite chez le couple *P. solivum*/

A. pisii, ont permis de préciser la nature biochimique de certaines substances produites, soit par le pathogène, soit par la plante hôte, ou encore par l'interaction des deux protagonistes.

Parmi les substances détectées, l'intensité de la fluorescence obtenue par le test au bleu d'aniline a révélé très nettement la présence d'importants dépôts de callose dans le cas du phénotype sensible. L'absence de cette substance durant les premiers stades de l'infection, et son accumulation tardive par rapport à l'apparition des symptômes, confirment le rôle similaire qui lui a été attribué par HINCH et CLARK, (1982) dans le brunissement et la formation de la nécrose du maïs infecté par *P. cinnamomi*. Son implication dans la résistance des plantes aux pathogènes est suggérée par plusieurs auteurs (DEFOSSE, 1976; INGRAM, 1976; BECKMAN et al., 1982; MISAGHI, 1982), elle n'a pu être démontrée au cours du processus d'infection du Pois par *A. pisii*. Les tests réalisés sur les couples incompatibles se sont révélés négatifs.

En ce qui concerne l'identification cytochimique des corps X et des substances denses aux électrons observés dans les méats, la réaction positive au test PATAg, signifie que ces dépôts contiennent des polysaccharides. Des observations analogues ont été faites sur d'autres couples hôte - parasite aussi bien dans le cas d'une interaction du type résistant: *Lycopersicon esculentum* / *Phytophthora capsici* (DURAND et SALLE, 1981), que dans celui d'une interaction du type tolérant: *Cicer arietinum* / *Ascochyta rabiei* (AMEZIANE EL HASSANI, 1981). Ces résultats demeurent cependant contradictoires avec ceux observés lors de l'infection du Pois par *A. pisii*, où ces mêmes substances sont plutôt caractéristiques d'une interaction du type sensible. Ils montrent que le rôle attribué aux corps X dans la limitation de l'extension de la

nécrose n'est pas le seul; leur éventuelle participation à d'autres mécanismes que celui de la résistance est à envisager.

Par ailleurs, les détails ultrastructuraux ayant porté sur la réactivité des parois, ont révélé des différences de réponses entre celles du pathogène et de l'hôte. Contrairement aux observations effectuées par COULOMB (1985) sur *Capsicum annuum* infecté par *Phytophthora capsici*, dans le cas du Pois, les parois cellulaires de l'*A. pisii* sont plus contrastés que celles de la plante hôte (*P. sativum*). Un résultat semblable a été rapporté par AMEZIANE EL HASSANI (1981) à propos de l'infection du Pois chiche (*Cicer arietinum*) par *A. roblei*. Sur la base des travaux de SCHRANTZ (1979), ces comportements apparemment contradictoires peuvent s'expliquer par des différences de composition biochimique des parois. Celles du champignon, plus riches en glucanes aux liaisons β , 1-3 et β 1-6, réagissent plus intensément au protéinate d'argent que celles du végétal, riches en β 1-4 glucanes et en protéines. Mais la synthèse des glucanes au niveau des dépôts pariétaux et leur rôle dans les mécanismes de résistance ou de sensibilité restent à élucider (DELON, 1975).

Quant à la caractérisation des événements enzymatiques intervenant au cours de l'infection du Pois (*P. sativum*) par *A. pisii*, la présence de quelques enzymes ou produits de leur activité, a été démontrée, en particulier, la phosphatase acide.

Antérieurement, cette enzyme avait été mise en évidence biochimiquement par des tests colorimétriques effectués soit à partir de filtrat de culture du champignon croissant en milieu agité, soit dans les tissus de Pois infectés par *A. pisii* (BOUZNAD, 1978). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par COULOMB et al., (1985) dans le cas de l'interaction

Capsicum annuum / *Phytophthora capsici*; toutefois le niveau de réactivité est beaucoup plus important dans notre matériel. Sa fréquente accumulation à proximité immédiate des hyphes mycéliens, suggère une origine fongique.

Si la présence et le lieu d'accumulation de la phosphatase acide ont été établis pour le couple compatible *P. sativum* / *A. pisii*, en revanche les organites cellulaires impliqués dans sa synthèse et les cibles de l'activité hydrolytique de l'enzyme identifiées par certains auteurs (WILSON, 1973; WHEELER, 1975 et COULOMB et al. 1985), dans différents couples hôte-parasite en présence de la Dihydroxyphénylalanine (D.O.P.A.) sont encore à préciser dans le cas de l' *A. pisii*.

La forte réactivité de certains des composés apparus durant l'infection dans les espaces cellulaires, suggère une participation active de la polyphénoloxydase (P.P.O.) dans ce processus. En identifiant cette enzyme, nous complétons non seulement la connaissance de l'arsenal enzymatique produit par *A. pisii* (HEATH et WOOD, 1971a; BOUZNAD, 1978), mais nous confirmons aussi son importance dans le métabolisme des phénols durant la formation de la nécrose (HEATH et WOOD, 1971b). L'approche cytochimique a permis de préciser la nature biochimique des deux types de dépôts. Les amas du type papille accumulés au niveau des parois cellulaires de l'hôte ayant réagi positivement à la D.O.P.A. sont de nature polyphénolique. Tel qu'il se présente (accompagné par une bande osmiophile), ce matériel peut effectivement jouer un rôle de barrière empêchant la progression du champignon (DELON, 1974; DURAND et SALLE, 1981). En ce qui concerne les dépôts localisés dans les angles des méats, leur très faible densité aux électrons après test à la D.O.P.A., constitue une preuve de leur nature non phénolique.

Indépendamment de cette différence de réaction, la présence en grande quantité des composés polyphénoliques, témoigne directement ou indirectement du rôle de ces enzymes d'oxydation (type P.P.O.) dans les mécanismes de formation de la nécrose de l'*A. pisii* (HEATH et WOOD, 1971), de l'*A. rabiei* (VIR et GREWAL, 1974; AMEZIANE EL HASSANI, 1981), et du *Phytophthora capsici* (DURAND et SALLE, 1981). D'autres auteurs ont indiqué chez d'autres couples que le polyphénoloxydase agirait par une oxydation des monophénols pour donner des composés phénoliques très toxiques pour les champignons (FRIC, 1976; COULOMB et COULOMB, 1984; WARD, 1986).

Dans le cas de l'interaction compatible *P. solivum*/*A. pisii*, ces substances polyphénoliques ne semblent pas avoir une action toxique directe sur le champignon. En effet, les observations ultrastructurales effectuées aux stades même avancés de la nécrose ont montré que le cytoplasme des hyphes intra et intercellulaires, à l'inverse de celui de la plante hôte, reste riche en organites. Par contre, l'action inhibitrice de ces phénols sur les enzymes de dégradation des parois cellulaires du Pois est plus probable (HEATH et WOOD, 1971). Un comportement comparable a été discuté lors de l'infection du Pois chiche par *A. rabiei* (VIR et GREWAL, 1974; AMEZIANE EL HASSANI, 1981).

Comparativement à la phosphatase acide et à la polyphénoloxydase, la peroxydase, dernière enzyme étudiée, a été très faiblement détectée dans les espaces intercellulaires de l'hôte. Si une corrélation positive a souvent été montrée entre les activités peroxydasiques et la résistance (HAMMERSCHMIDT et al., 1982; COULOMB et COULOMB, 1984; ARORA et BAJAJ, 1985; CADENA et al., 1987; ABBATISTA et al., 1988; PATYKOWSKI et al., 1988), sa faible présence dans le cas du Pois peut s'expliquer soit par des problèmes techniques de mise en évidence de l'activité enzymatique, soit par le fait

que les observations n'ont porté que sur les tissus de Pois sensible. La première hypothèse va dans le sens des conclusions d'étude faite par DELON, (1974) sur la détection de cette enzyme dans certains organites des cellules racinaires de Tomates parasités par *Pyrenochaeta Lycopersici*. Quoiqu'il en soit nos observations cytochimiques sur les substances phénoliques complètent les résultats biochimiques obtenus par HEATH et WOOD, (1971) sur le même couple. De plus, l'existence de polyphénols dans ces tissus devrait aller de pair avec une forte activité peroxydasique comme cela a été établie par FRIC, (1976); SHERWOOD et VANCE, (1980); COULOMB et COULOMB, (1984) et WARD, (1986).

Les travaux initiés sur le rôle des peroxydases dans la résistance doivent être poursuivis au niveau de l'interaction compatible et incompatible. De plus la détection cytochimique devra être complétée par des dosage biochimiques de l'activité enzymatique.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHES

Parmi les problèmes liés à la stagnation des rendements des légumes secs en Algérie, bien souvent, les maladies fongiques constituent le facteur limitant, aussi bien pour la production des semences, que pour la production destinée à la consommation.

Avec l'extention importante des superficies cultivées, observées durant ces dernières années et la priorité qui est accordée à ces cultures, les risques de multiplication des maladies augmentent. Cette évolution dangereuse a justifié en partie le choix de notre recherche.

En abordant le problème particulier des anthracoses sur ces cultures, nous avons mis en évidence la présence en Algérie d'autres espèces d'*Ascochyta* que celles habituellement rencontrées dans les cultures de Pois (*A. pisi*, *A. pinodes* et *A. pinodella*. Citons par ordre d'importance *A. rabiei* sur Pois chiches, *A. viciae* sur Vesces, *A. fabae* sur Fèves et Feverolles, *A. lentis* sur Lentilles et *A. lathyri* sur Gesses. Pour la plupart de ces espèces fongiques, il s'agit d'un premier isolement dans le pays.

Ces espèces d'*Ascochyta* constituent un groupe d'agents pathogènes très comparables de par la présence de macules nécrotiques sur les différents organes végétatifs aériens et les gousses. Ces macules caractérisées par un halo clair, au centre duquel se trouvent des pycnides noires et saillantes.

Bien que difficile à mettre en évidence, nous avons montré également la présence de l'*A. pinodes* et de *A. pinodella*, sur la plupart des autres légumineuses cultivées ou spontanées (Pois chiches, Fèves, Gesses, Vesces et Haricots).

La caractérisation morphologique et culturale à des fins taxonomiques a montré une hétérogénéité très marquée de la forme et de la dimension des spores et des pycnides. Sur la base de ces deux caractères, nous avons distingué deux principaux groupes d'espèces: le groupe renfermant les espèces à grandes spores souvent pluricellulaires: *A. fabae*, *A. lentis*, *A. viciae*, *A. pisi*, *A. lathyri* et *A. pinodes*; et le groupe à forte proportion de spores monocellulaires et de taille très variable: *A. roblei*, *A. phaseolorum* et *A. pinodella*.

Pour certaines de ces espèces comme *A. pinodella* et *A. phaseolorum*, la position systématique a longtemps été controversée. Actuellement l'appartenance de ces deux espèces au genre *Phoma*, respectivement *P. phaseolorum* et *P. medicaginis* var. *pinodella*, est bien établie.

En revanche, la présence d'une forte proportion de spores monocellulaires, souvent prise en compte pour la définition du genre *Phoma*, nous a amené à discuter l'éventuel rattachement de l'espèce *A. roblei* au genre *Phoma*.

En ce qui concerne *A. pisi* et *A. viciae* la distinction entre les deux espèces présente encore une certaine difficulté. Cependant, les observations morphologiques et culturales effectuées sur plusieurs isolats d'origines géographiques très diverses, ont montré que les deux espèces sont totalement différentes.

Une étude ultrastructurale approfondie et comparative de la conidiogenèse chez toutes les espèces précédemment présentées, a permis d'éclaircir une systématique assez confuse au sein de ce groupe d'agents pathogènes.

Dans tous les cas, les cellules conidiogènes ont un fonctionnement du type phialidique identique à celui observé chez le genre *Phoma*. Les caractères ontogéniques déterminants du type annellidique n'ont pas été mis en évidence au cours de nos observations. Il devient alors difficile d'accepter les différences qui ont été proposées entre le genre *Ascochyta* et *Phoma*.

Cependant, contrairement à notre attente, l'étude ultrastructurale de la conidiogenèse reste peu accessible et d'une efficacité quelquefois douteuse dans le cas particulier des *Ascochyta* spp.

Dans bien des cas, l'identification d'une espèce fongique basée sur la caractérisation morphologique et ontogénique des organes de reproduction du champignon est suffisante. Cependant, lorsqu'il s'agit d'espèces très proches parasitant un groupe de plantes botaniquement voisines, leur degré de compatibilité avec la plante hôte doit être précisé pour une détermination rigoureuse. Dans le cas des espèces d'*Ascochyta* isolées à partir des légumineuses, leur pouvoir pathogène et leur spécialisation parasitaire ont été évalués après inoculations artificielles. Cette approche a tout d'abord confirmé la polyphagie des deux espèces *A. pinodella* et *A. pinodes* sur la plupart des légumineuses. Pour les autres espèces: *A. pisi*, *A. fabae*, *A. lentis*, *A. viciae*, *A. rabiei* et *A. lachyri*, nous avons constaté une haute spécificité vis-à-vis de leur hôte d'origine.

Grâce à ces derniers résultats, nous sommes en mesure d'affirmer que *A. pisi* et *A. viciae* sont deux espèces bien distinctes.

Sur le plan agronomique, ces résultats révèlent les risques auxquels les cultures de légumineuses peuvent être exposés si un assolement correct n'est pas respecté. En effet, le rôle joué par les débris de culture dans la conservation de l'*A. pinodes* et l'*A. pinodella* au niveau du sol, constitue une source de contamination pour l'ensemble des cultures. Par contre, en raison de leur spécificité parasitaire stricte *A. pisi*, *A. fabae*, *A. lentis*, *A. robbei*, *A. viciae*, semblent ne pas présenter un danger équivalent.

Dans la deuxième partie de notre travail consacrée essentiellement à l'antracnose du Pois causée par *A. pisi*, les exigences biologiques et la variation du pouvoir pathogène du champignon ont été approfondies. C'est ainsi que l'étude *in vitro* portant sur le comportement de différents isolats d'*A. pisi*, a permis de préciser le rôle essentiel joué par le facteur température. Nous avons constaté que si les conditions optimales de production de l'inoculum (germination, croissance mycélienne, sporulation), se situent à une température relativement élevée (20 - 22°C) en revanche, les plus forts taux de transmission par les semences, sont observés pour des températures plus basses (5-12°C). Dans ce dernier cas, la température agirait en ralentissant la levée, permettant ainsi au champignon d'infecter les premiers organes de germination. En plein champ, il a été vérifié que les régions froides, caractérisées par des périodes de levée plus longues, sont plus contaminées que les régions à climat plus doux où les temps de levées sont nettement plus courts.

La connaissance des exigences biologiques et des conditions optimales d'infection du Pois par *A. pisi*, a rendu possible l'étude de la variabilité du pouvoir pathogène de

ce champignon. A la lumière des résultats obtenus, l'interaction différentielle constatée entre les cultivars de l'hôte et les isolats du pathogène, confirme l'existence de races physiologiques chez *A. pisi*. En effet, le classement des cultivars établi en fonction des niveaux d'agressivité d'une part, et de leur sensibilité ou résistance, d'autre part, s'est révélé très variable suivant le groupe d'isolats utilisé. En particulier, il a été noté la présence en Algérie et en France, de la race C, l'une des plus virulentes et la plus répandue en Europe, notamment en Angleterre et aux Pays Bas, conséquences vraisemblables des échanges commerciaux de semences. Pour certains isolats appartenant à ce pathotype, la variabilité de leur niveau d'agressivité, suggère l'existence de biotypes différents.

Par ailleurs, l'isolat *A. pisi* (L/G) provenant du Lot-et-Garonne (France), s'est montré virulent même sur les deux cultivars "Rondo" et "Finale", considérés jusqu'à alors comme résistants. Ces dernières observations permettent d'affirmer que la résistance génétique de type absence totale de symptômes ne semble pas exister chez le Pois. Cependant comparativement aux autres cultivars, et de par le niveau élevé de leur résistance, les deux derniers cultivars restent d'excellents géniteurs pour l'amélioration de la résistance du Pois vis-à-vis de l'antracnose.

Grâce à la disponibilité de ces cultivars présentant une nette différence de comportement par rapport aux cultivars sensibles du type "Merveille Kévedon", il a été possible d'examiner les événements essentiels accompagnant l'installation de l'interaction hôte-parasite chez un couple compatible et chez un incompatible. A cet effet, nous avons étudié le processus de l'infection depuis les premières phases précédant la pénétration de l'hôte par le champignon, jusqu'à la formation de la nécrose.

Les observations obtenues en microscopie électronique à balayage ont montré que le processus initial d'infection du Pois par *A. pisii*, est grandement influencé par la morphologie extérieure de l'hôte. Celle-ci déterminée par la présence très variable des cires épicuticulaires, est liée soit aux conditions de développement de l'hôte, soit à l'âge ou à la nature de l'organe végétal lui-même. Expérimentalement, il a été observé que la suppression mécanique des cires épicuticulaires, diminue sensiblement les délais de pénétration habituels pour les cultivars.

Les différences de pénétration de l'*A. pisii* observées dans les cas d'absence ou de présence des cires épicuticulaires (respectivement sur épicotyles ou sur folioles), suggèrent que ces cires n'ont aucune action chimique. Elles doivent être considérées plutôt comme une barrière physique, puisque la germination et la croissance des tubes germinatifs des conidies ne sont pas inhibées. Néanmoins, une étude précise de la relation existant entre la composition biochimique des cires et la résistance du Pois à l'*A. pisii* est à envisager pour une confirmation de notre hypothèse.

En dehors des rares cas d'entrée par les stomates, la pénétration directe de l'organe infectieux à travers la cuticule intervient le plus souvent après la formation d'un appressorium, suivi d'un renflement mycélien sous-cuticulaire. Celui-ci est d'autant plus marqué aux endroits dépourvus de cires à la surface de l'hôte. Cette pénétration ne semble pas s'effectuer de manière enzymatique. En effet, l'emploi du Di-isopropylfluorophosphate, un inhibiteur des cutinases n'a montré aucun effet, ni sur la germination des conidies, ni sur la pénétration. Eventuellement, des recherches immunoenzymatiques pourraient apporter plus de précisions sur cette étape.

Néanmoins en étudiant les événements cytologiques intervenant au cours du processus infectieux, les observations ultrastructurales effectuées sur la paroi épidermique de l'hôte ont permis de distinguer, l'existence de deux couches morphologiquement distinctes et d'épaisseur inégale. L'organisation lamellaire et compacte pour le cultivar résistant et amorphe pour le sensible, pourrait expliquer les différences de comportement de l'un par rapport à l'autre. Avec les cires épicuticulaires et la cuticule, la paroi épidermique constituerait la première barrière physico-chimique de résistance du Pois à l'antracnose. Une analyse biochimique de ces trois constituants, en relation avec le niveau de résistance, devrait confirmer cette éventualité. Si durant ces premiers stades d'infection, la M.E.T. semble indiquer une pénétration mécanique, dans d'autres cas aucune action de ce genre n'a été constatée, suggérant ainsi une pénétration enzymatique. Ces variations de comportement nous ont amené à considérer que la pénétration n'est pas exclusivement mécanique ou enzymatique, mais qu'elle pourrait faire intervenir les deux actions à des proportions qui restent à préciser.

Après la pénétration et indépendamment de la nature génétique de l'hôte, les renflements sous-cuticulaires observés étaient comparables aux vésicules de certains champignons biotrophiques ou hémibiotrophiques. La progression des hyphes à l'intérieur des cellules sous-jacentes se fait ensuite de manière inter et intracellulaire. Ces observations sont généralement caractéristiques d'une relation trophique du type hémibiotrophique.

Ultérieurement, il a été montré que des modifications d'ordre morphologique et cytochimique relatives aux interactions compatibles et incompatibles, sont détectées à des degrés très différents. Parmi les événements accompagnant le processus d'infection du Pois par *A. pisi*, seuls

Les dépôts observés en apposition avec le champignon entre la paroi squelettique et le plasmalemme des cellules de l'hôte, semblent avoir un lien avec la résistance. Quant aux structures hémisphériques plaquées contre les parois des méats cellulaires dites "Corps X" et aux dépôts localisés préférentiellement dans les angles des méats, leur accumulation chez les cultivars sensibles est un indice de leur rôle dans la formation de la nécrose. D'autres différences de réponses entre les interactions compatible et incompatible ont été encore notées. Il s'agit principalement de la réorientation des chloroplastes chez l'hôte résistant et de leur destruction assez rapide chez l'hôte sensible. En revanche chez l'hôte résistant le système membranaire conserve plus longtemps son intégrité. Pour les autres organites, les différences n'ont pas été aussi évidentes. En ce qui concerne le pathogène, une vacuolisation importante et un cytoplasme réduit comportant peu d'organites sont observés dans l'hôte résistant, alors qu'au niveau de l'hôte sensible les hyphes sont normalement conservés.

D'une manière générale, le stade souvent avancé auquel les observations ont été faites, a surtout précisé la genèse de la nécrose. Si ce travail devrait être poursuivi, il conviendrait d'envisager des stades d'infection plus précoces pour saisir tous les détails du processus.

La tentative d'approche cytochimique pour caractériser l'interaction *P. solivum/A. pisii*, a permis de préciser la nature biochimique de quelques enzymes ou de leurs produits de réaction dans l'interaction compatible. Plusieurs des métabolites sécrétés par la plante et / ou le pathogène ont pu être identifiés et localisés. Nous avons signalé notamment la nature callosique de certains dépôts apparaissant lors de la formation de la nécrose. De même la réalisation du test de THIERY a indiqué la nature polysaccharidique des accumulations dans les méats et entre autres celles des "Corps X".

Parmi les enzymes secrétés par l'hôte, ce sont essentiellement les polyphénoloxydases et à moindre degré les peroxydases qui ont été mis en évidence; ces enzymes d'oxydation sont connues pour leur participation dans la synthèse des polyphénols. De telles substances sont souvent impliquées dans les mécanismes de résistance des plantes et la formation de nécroses, comme cela est suggéré dans le cas du Pois. En ce qui concerne les enzymes secrétées par le pathogène, la détection de la phosphatase acide en quantité importante dans l'environnement immédiat des hyphes constitue un donnée supplémentaire concernant l'arsenal enzymatique utilisé par *A. pisii* durant la pathogénèse.

A la lumière des résultats obtenus concernant la diversité des structures et des métabolites mis en place par les deux types d'interaction, compatible et incompatible, nous confirmons la complexité des phénomènes ultrastructuraux et cytochimiques qui sont généralement observés dans les relations hôte-parasite. Sans sous-estimer les résultats positifs obtenus relatifs à la connaissance du couple *P. sativum/A. pisii*, nous considérons indispensable de préciser ultérieurement la chronologie de l'intervention dans la pathogénèse des métabolites et des médiateurs chimiques.

B I B L I O G R A P H I E

- ABBATISTA, G.I., FERRARIS L., and MATTA A. 1983. Variations of Phenoloxidase activities as a consequence of stress that induce resistance to *Fusarium* wilt of tomato. *J. Phytopathology*, 122, 45 - 53.
- AIST, J.R. 1976. Papillae and related wound plugs of Plant cells. *Ann. Rev. Phytopathol.* 14, 145 - 163.
- AIST, J.R. 1983. Structural responses as resistance mechanism. In the dynamic of host defence, Eds J.A. BAILEY and B.J. DEVERALL, Academic Press, pp 33-69.
- AKAI, S., HORINO O., FUKUTOMI, M., NAKATA, A., KUNOH H., and SHIRAISHI, M. 1971. Response of host to infection: Cell wall reaction to infection and resulting change in cell organelles. In Morphological and biochemical events in plant parasite interaction, Eds S. AKADI and S. OUCHI. The Phytopathological Society of Japan TOKYO, pp. 329 - 347.
- ALBERSHEIM, P., and VALENT, B.S., 1978. Host-pathogen interactions in plants, *J. Cell. Biology*, 78 , 627 - 643.
- ALI, S.M., NITSCHKE, L.F., DUBE, A.J., KRAUSE, M.R., and CAMERON, B. 1978. Selection of peas lines for resistance to pathotypes of *Ascochyta pinodes*, *A. pisi* and *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. *Aust. J. Agric. Res.*, 29, 841 - 849.
- ALLARD, C. 1974. Etude histologique en microscopie optique de la résistance du Haricot (*Phaseolus vulgaris*) à l'antracnose (*Colletotrichum Lindemuthianum*) gouverné par le gène Cornell. *Ann. de Phytopathologie*, 6, 359 - 383.
- ALLARD, C. 1982. Les maladies du Pois proteagineux. *Phycoma*, 3, 21 - 23.
- ALLARD, C., COUSIN, R., et LAMARQUE, C. 1978. Les maladies en végétation du Pois. *Perspectives agricoles (ITCF)* 13, 51 - 56.
- AMEZIANE EL HASSANI, A. 1979. Quelques aspects de la biologie d'*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. D.E.A. d'Agro-nomie, E.N.S.A., Rennes, 28 p.

- AMEZIANE EL HASSANI, A. 1981. Modalités d'expression de la résistance d'un cultivar de Pois chiche (*Cicer arietinum* L.) à *Ascochyta nabeli* (Pass.), Lab. Thèse Docteur Ingénieur, ENSA Rennes, 41 p.
- ANDO, K., and KATSUYA, K. 1984. The nuclear condition of urediniospores produced in the axenic cultures of wheat leaf rust, *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 25, 75 - 84.
- ANONYME, 1983. The slide germination method of evaluating protectant fungicides, *Phytopathology*, 39, 627-632.
- ANONYME, 1976. International rules for seed testing. *Seed Sci. and Technol.*, 4, 557 - 751.
- ANONYME, 1985. Statistiques agricoles. Série Ministère de l'Agriculture (Alger).
- ANSELME, C. 1967. Importance de l'utilisation de semences saines dans la production des plantes, *Défense des végétaux*, 126.
- ANSELME, C., CHAMPION, R., BRUNET, D., et SLANIOTTO F. 1971. La désinfection des semences de Pois contaminées par *Ascochyta pisi* Lib., *Ascochyta pinodes* (Berk, et Blox) Jones et *Ascochyta pinodella* Jones, agents de l'antracnose. *Phytologie. Phytopharmacie*, 20, 13-21.
- ANSELME, C., et CHAMPION, R. 1971. La désinfection des semences de Pois. *Phytologie - Phytopharmacie*. 20, 1 - 13.
- ANSELME, C., HEWETT, P.D., and CHAMPION R. 1970. The detection and importance of *Ascochyta pisi* Lib. on seed peas. VII^e International Congress of Plant Protection. Paris.
- ARORA, Y.K., and BAJAJ, K.L. 1985. Peroxidase and Polyphenoloxidase associated with induced resistance of Mung Bean to *Rhizoctonia solani* Kuen. *Physiopath. Z.* 114, 325 - 331.
- ARSANTO, J.P. 1972. Localisation infrastructurale des activités phosphatasiques acides au cours de la différenciation des tissus conducteurs de l'épicotyle de *Lycopersicon esculentum*. *C.R. Acad. Sci.*, 274, 2041-2044.

- BAILEY, J.A. 1982. Physiological and biochemical events associated with the expression of resistance to disease. In Active defense mechanisms in plants. Ed. by R.K.S. WOOD, Plenum Press. New York. 39 - 65.
- BAILEY, J.A. 1983. Biological perspectives of Host-Pathogen interactions. In The dynamics of host defence. Eds J.A. BAILEY and B.J. DEVERALL. Academic Press. p. 1 - 31.
- BAJAN, C. 1968. Investigation on the pathogenicity and biology of three species of the genus *Ascochyta* occurring pea (*Pisum sativum*). *Acta Agrobotanica*, 21, 17 - 74.
- BANNEROT, H. 1965. Résultats de l'infection d'une collection de Haricot par six races physiologiques d'antracnose. *Ann. Amélior. Plantes*, 15, 201 - 222.
- BEAUMONT, A. 1950. On the *Ascochyta* spot disease of broad beans. *Trans. Br. Myc. Soc.*, 33, 345 - 349.
- BECKMAN, C.H. 1982. Defences triggered by the invader: physical defences in : Plant disease, an advanced treatise. Eds J. HORSFALL, and E. COWLING, Vol. 5, Academic Press, New York, pp 225 - 245.
- BECKMAN, C.H., MUELLER C.W., TESSIER, B.J., and HARRISSON, N.A. 1982. Recognition and callose deposition in response to vascular infection in *Fusarium* wilt - resistant of susceptible tomato plants. *Physiol. Plant Pathol.*, 20, 1 - 10.
- BENADA, J. 1970. Observation on early phases of infection by powdery mildew (*Erysiphe graminis* D.C.), *Phytopathol. Z.*, 68, 181 - 187.
- BISHOP, C.D., and COOPER, R.M. 1983. An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt disease. *Physiol. Plant Pathol.*, 22, 15 - 27.
- BLACKEMAN, J.P., and ATKINSON, P. 1976. Evidence for a spore germination inhibitor co-extracted with wax from leaves. In *Microbiology of aerial plant surfaces*. Eds C.H. DICKINSON, and T.F. PREECE, Academic Press, p 441 - 449.
- BLACKEMAN, J.P., and DICKINSON, C.M., 1967. The effect of ultraviolet and visible light on infection of host leaf tissue by four species of *Ascochyta*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 50, 385 - 396.

- BLACKEMAN, J.P., and SZTEJNBERG, A. 1973. Effet of surface waxes on inhibition of germination of *Botrytis cinerea* spores on beet root leaves. *Physiol. Plant Pathol.*, 3, 269 - 278.
- BLANCHARD, R.O. 1973. Two cytological responses in corn resistant to *Helminthosporium maydis*. *Can. J. Bot.*, 51, 2520 - 2521.
- BOEREMA, G.H. 1972. *Ascochyta phaseolorum* synonymous with *Phoma exigua*. *Neth. J. Pl. Path.*, 78, 113 - 115.
- BOEREMA, G.H. and BOLLEN, H.J. 1975. Conidiogenesis and conidial septation as differentiating criteria between *Phoma* and *Ascochyta*. *Persoonia*, 8, 111 - 144.
- BOEREMA, G.H., and VERHOEVEN, A.A. 1979. Check list for scientific fungi serie 2 C: fungi on field crops: pulse and forage crops. *Neth. J. Plant Path.*, 4, 151 - 181.
- BOEREMA, G.H., DORENBOCH, M.M.J., and LEFERING, L. 1965. A comparative study of black stem fungi on lucerne and red clover and the foot rot fungus on pea. *Neth. J. Plant Path.*, 71, 79 - 89.
- BOISSIERE, M.C. 1972. Cytologie du *Peltigera canina* en microscopie électronique. I: Premières observations. *Rev. Gen. Bot.*, 79, 167 - 185.
- BOISSIERE, M.C. 1979. Cytologie du *Peltigera canina* en microscopie électronique: Le Mycobionte à l'état végétatif. *Revue de Mycologie*, 43, 1 - 70.
- BOMPEIX, G. 1972. Recherches sur la biologie du *Pezizula alba* Guthrie. Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences Naturelles. Univ. Paris VI, 232 p.
- BOMPEIX, G. 1974. Action de la lumière et de la température sur le comportement du *Pezizula alba* et *Pezizula malicorticis*. *Ann. Phytopathol.*, 6, 13 - 24.
- BOMPEIX, G., et COLENO A. 1984. Problèmes de terminologie des subdivisions intraspécifiques des plantes hôtes et des agents pathogènes. 26ème Colloque de la S.F.P., INRA France.

- BONDARTZEVA-MONTEVERDE, V.N., and VASSILIEVSKY, N.I. 1937. Ascochytirosis of the pea. URSS. Acad. Sci., Press Moscow. In Rev. Appl. Mycol., 17, 427 - 428.
- BOORSMA, P.A. 1980. Variabilité de la résistance à l'antracnose chez le Pois chiche. Bull. Phytosanitaire F.A.O., Vol. 28.
- BOUZNAD, Z. 1976. Contribution à l'étude de la mycoflore des semences de Pois et d'Haricot. Mémoire Ingénieur, I.N.A. El-Harrach Alger, 85 p.
- BOUZNAD, Z. 1978. Contribution à la connaissance de quelques aspects biologiques et physiopathologiques de l'antracnose du Pois causée par *Ascochyta pisi* Lib., Thèse Magister, I.N.A. El-Harrach Alger, 149 p.
- BOUZNAD, Z. 1983. Inventaire de la mycoflore des semences de Légumineuses et étude des maladies à anthracnoses. Rapport d'Activité scientifique 1983. Programme de recherche Pathologie des Plants et Semences. CERAG-INA El-Harrach Alger, (Document).
- BOUZNAD, Z., et MOHAMMEDI, S. 1987. Les anthracnoses des Légumineuses en Algérie. Quelques aspects systématiques et pathologiques du genre *Ascochyta*. 1ère Congrès de La S.F.P. Rennes, 19 - 20 Novembre.
- BOUZNAD, Z., LOUNIS, R., et BADJI, H. 1982. Contribution à la connaissance des agents pathogènes portés par les semences de Pois et Pois chiches. Communication 11ème journées de la recherche agronomique, Juin 1982. CERAG/ONRS, I.N.A. El-Harrach Alger.
- BOUZNAD, Z., LABDI, M., DJAOUI, A., et ZAATRI, M. 1987. L'antracnose du Pois chiche causée par *Ascochyta rabielii* (Pass) Lab. en Algérie: variabilité du pouvoir pathogène et essai de comportement des variétés locales et introduites. 1ères journées nationales sur la protection des cultures contre les maladies et mauvaises herbes. 29 - 30 Novembre. I.N.A. El-Harrach. Annales Institut National Agronomique El-Harrach Alger, (sous-
presse).
- BRANCHARD, M. 1985. Culture in vitro de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) et de *Rhynchosporium secalis* (OUD.) DAVIS. Application à l'étude des relations hôte-parasite. Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences naturelles. Univ. Paris Sud-Orsay.

- BREWER, D. 1960. Studies in *Ascochyta pisi* Lib., Can. J. Bot., 38, 705 - 717.
- BREWER, J.G., and BOEREMA, G.H. 1965. Electron microscope observations on the development of pycniospores in *Phoma* and *Ascochyta* spp. Proc. K. Ed. Akad. Wet. (C) Mycology, 68, 86 - 97.
- BREWER, D., and MacNEIL, B.H. 1953. Preliminary studies in *Ascochyta pisi* Lib. Can. J. Bot., 31, 739 - 744.
- BROSSARD 1973. Le bourgeonnement épiphyllé chez le *Bryophyllum daigremontianum* BERGER (Crassulacées). Etude cytochimique, cytophotométriques et ultrastructurale. Ann. Sc. Nat. Bot., 14, pp 93 - 214.
- BUCHANAN, P.K. 1987. A reappraisal of *Ascochyta* and *Ascochyta* (Coelomycètes). Mycol. Pap. 156, C.A.B. International Mycological Institute. pp 1 - 83.
- BYRDE, R.J.W., and CUTTING, C.V. 1973. Fungal Pathogenicity and the Plant's Response. Academic Press.
- CARMICHAEL, J.W. 1956. The cellophane technique for studying morphology and fusion in fungi *Mycologia*, 48, 450-453.
- CATESSON, A.M., et CZANINSKI, Y. 1967. Mise en évidence d'une activité phosphatasique acide dans le reticulum endoplasmique des tissus conducteurs de robinier et de sycomor. J. Microscopie, 6, 509 - 514.
- CHAIBI-COSSENTINI 1978. Modifications ultrastructurales et cytoenzymatiques de l'appareil de Golgi, du Réticulum endoplasmique et des Mitochondries dans les cellules de l'apex radriculaire de jeunes plantes de *Medicago sativa* L. (Cultivar Gabes) traitées par une solution saline. Ann. Sc. Nat. Bot., 19, 95 - 124.
- CHAMPION, R. 1969. Quelques parasites cryptogamiques importants transmis par les semences. Extrait de La Revue Agriculture, 322, 3 - 8.
- CHAMPION, R. 1978. Les maladies transmises par les semences du Pois et de la FEVEROLLE. Perspectives agricoles (ITCF), 13, 42 - 64.

- CHAMPION, R., BOURDIN, G., et BERTIER, G. 1984. L'antracnose du Pois. Détermination des agents responsables et efficacité de divers fongicides en traitement de semences. Perspectives Agricoles, 77, 14 - 19.
- COCHRANE, V.W. 1958. Physiology of fungi. Ed. WILEY, New York, 524 p.
- COCHRANE, V.W. 1960. Spore germination. In Plant pathology. Eds J.G. HOSFALL and A.E. DIMOND, Academic Press. New York, pp 167 - 202.
- COFFEY, M.D., and WILSON, U.E. 1983. An ultrastructural study of the late blight fungus *Phytophthora infestans* and its interaction with the foliage of two potato cultivars possessing different levels of general (field) resistance. Can. J. Bot., 61, 2669 - 2685.
- COLE, G.T. 1981. Conidiogenesis and conidiomatal ontogeny. In Biology of conidial fungi, Vol. 2 Eds G.T. COLE, and B. KENDRICK. Academic Press. pp 271 - 327.
- COLE, G.T., and SAMSON, R.A. 1979. Patterns of development in conidial fungi, Ed. PITMAN.
- COLENO, A. 1979. Mécanismes de reconnaissance entre l'hôte et le parasite. Bull. Soc. Bot. Fr., 126, Actual. Bot., 4, 51 - 61.
- COLOTELO, N., and GRINCHENKO, A.H.H. 1962. Growth of *Kabatella caulivora* on different media. Can. J. Bot., 40, 439 - 446.
- COLSON, M., 1979. Localisation ultrastructurale de l'activité phosphatasique acide et des phosphates dans les racines d'*Allium cepa* en vie latente. Ann. Sc. Nat. Bot., 1, 39 - 50.
- CONTRERAS, M.R., and BOOTHROYD, C.W. 1975. Histological reactions and effects on position of epidermal nuclei in susceptible and resistant corn inoculated with *Helminthosporium maydis* Race T. Phytopathology, 65, 1075-1078.

- CONTI, G.G., BASSI, M., MAFFI, D., and BONECCHI, R. 1985. Host-parasite relationship in susceptible and a resistant rose cultivar inoculated with *Sphaerotheca pannosa*. II-Deposits rates of callose, lignine and phenolics in infected or wounded cells and their possible role in resistance. *Phytopath. Z.*, 117, 312 - 320.
- COOPER, R.M. 1982. Pathogens induced changes in host ultra-structure. In *Plant disease control: Resistance and susceptibility*, Eds R.C. STAPLES, and G.H. TOENNIESSEN W.I.P. JOHN WILLEY and SONS, 105 - 142.
- COULOMB, P. 1969. Mise en évidence de structures analogues aux lysosomes dans le méristème radicaire de la courge. *J. Microscopie*, 8, 123 - 138.
- COULOMB, C., COULOMB, P.J. et MICHEL, G. 1982. Use of Triton WR-1339 in Cytochemical characterisation of Phytolysosomes. *Histochem. J.*, 14, 175 - 196.
- COULOMB, C., et COULOMB, P. 1984. Etude de l'activité peroxydasique dans les feuilles de *Capsicum annuum* (Piment), infectées par le *Phytophthora capsici* (mildiou). *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 6, 227 - 235.
- COULOMB, C., LORIENT, R., et COULOMB, P.J. 1985. Etude ultra-structurale et cytochimique d'un champignon pathogène, le *Phytophthora capsici*, au cours de l'infection des feuilles de Piment de variété sensible. Mise en évidence d'un système phytolysosomal actif. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 7, 23 - 38.
- COUSIN, R. 1984. Comportement des variétés de Pois aux principales maladies. *Perspectives Agricoles*, 77, 11 - 13.
- COUSIN, R. 1972. Contribution à l'étude de la résistance à quelques maladies des Pois. *Eucarpia*, section horticole, Versailles 9 - 10 Juin. I.N.R.A. France.
- CRAIGIE, J.H., and GREEN, G.J. 1962. Nuclear behaviour leading to conjugate association in haploid infections of *Puccinia graminis*. *Can. J. Bot.*, 40, 163 - 178.
- CRUICKSHANK, I.A.M., and PERRIN, D.R. 1965. Studies on phytoalexins, IX: Pisatin formation by cultivars of *Pisum sativum* L. and several other *Pisum* species. *Aust. J. Biol. Sci.*, 18, 829 - 835.

- CUTTER, E.G. 1976. Aspects of the structure and development of the aerial surfaces of higher plants. in Microbiology of aerial plant surface. Eds C.H.DICKINSON and T.F. Preece, Academic Press, pp 1 - 40.
- CZANINSKI, Y. 1979. Cytochimie ultrastructurale des parois du xylème secondaire. Biol. Cellulaire, 35, 97 - 102.
- CZANINSKI, Y., et CATESSON, A.M. 1969. Localisation ultrastructurale d'activités peroxydasiques dans les tissus conducteurs végétaux aux cours du cycle annuel. J. Microscopie, 8, 875 - 888.
- CZANINSKI, Y., et CATESSON, A.M. 1970. Activités peroxidasi-ques d'origines diverses dans les cellules d'*Acer pseudoplatanus* (Tissus conducteurs et cellules en cultures). J. Microscopie, 9, 1089 - 1102.
- CZANINSKI, Y., et CATESSON, A.M. 1972. Localisation ultrastructurale d'activités polyphénoloxydasiques dans les chloroplastes de *Nicotiana glutinosa*. J. Microscopie. 15, 409 - 414.
- DARBY, P., LEWIS, B.G., and MATTHEWS, P. 1986. Diversity of virulence within *Ascochyta pisi* and resistance in the genus *Pisum*. Plant Pathology, 35, 214 - 223.
- DARBY, P., LEWIS, B.G., and MATTHEWS, P. 1985. Inheritance and expression of resistance to *Ascochyta pisi* In: the Pea Crop, Eds P.D. HEBBLETH, M.C. HEATH and T.C.K. DAWKINS, pp 231 - 250.
- DARGENT, R., et TOUZE, A. 1974. Etude cinétique, en microscopie électronique, des interactions entre *Colletotrichum lagenarium* et les cellules foliaires de *Cucumis melo*. Can. J. Bot., 52, 1319 - 1323.
- DAY, P.R. 1974. Genetics of host-parasite interaction. Eds W.H. FREEMAN and Compagny. San Francisco, 238 p.
- DAY, P.R., and SCOTT, K.J. 1973. Scanning electron microscopy of fresh material of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. Physiol. Plant Pathol., 3, 433 - 435.
- DEFOSSE, L. 1971. Recherches histochimiques sur la pénétration du *Cercospora herpotrichoides* (Fron) dans les graines foliaires des céréales, Phytopath. Z., 70, 1 - 10.

- DEFOSSE, L., et DEKEGEL, D. 1974. Pénétration de *Cercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton, dans le Coleoptile du froment (*Triticum vulgare*) observée en microscopie électronique, *Ann. Phytopathol.*, 6, 471 - 474.
- DEFOSSE, L. 1976. Recherches histochimiques sur la nature des réactions pariétales formées en réponse à la pénétration de *Cercospora herpotrichoides*. (Fron) dans le coléoptile du blé, *Parasitica*, 32, 147 - 157.
- DEKKER, J. 1957. Internal seed disinfection of peas infected by *Ascochyta pisi* by means of the antibiotics rimocidin and some aspects of the parasitism of this fungus (netherlandais), Eds H. VEEMAN and ZONEN WAGENINGEN, 80 p.
- DELON, R. 1974. Localisation d'activités polyphénoloxydasiques et peroxydasiques dans les cellules racinaires de *Lycopersicon esculentum* Miller (var. Marmande) parasitées par *Pyrenochaeta lycopersici* Gerhch et Scheider. *Phytopath. Z.*, 80, 199 - 208.
- DELON, R. 1975. Etude ultrastructurale et cytochimique de racines de Tomates (*Lycopersicon esculentum* var. Marmande) parasitées par *Colletotrichum coccodes*. *Phytopath. Z.*, 80, 322 - 342.
- DICKMAN, S., PATIL, S., and KOLATTUKUDY, P.E. 1982. Purification, caractérisation and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* Pers. on *Carica papaya*. *Physiol. Plant Pathol.*, 20, 33 - 47.
- DICKINSON, C.H., and LUCAS, J.A. 1977. *Plant Pathology and Plant Pathogens* vol. 6, *Basic Microbiology*. Ed. J.F. WILKINSON., BLACK WELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS. OXFORD, LONDON 161 p.
- DJAOUI, A. 1986. Etude de l'antracnose du Pois chiche : Pouvoir pathogène et comportement variétal vis à vis de quelques souches d'*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. These Ing. I.N.A. EL-Harrach Alger 53 p.
- DJERBI, M., KERLAN, C., et BOMPEIX, G. 1974. Observations sur la morphogénèse et la cytologie des fructifications du *Septoria tritici* Rob. et Desm. *Ann. Agron. de l'I.N.A. Tunisie*.

- DJERBI, M. 1978. Contribution à l'étude de la fusariose à *Fusarium roseum* (Link) Snyd. et Hans et de la Septoriose à *Septoria tritici* Rob. et Desm. du blé. Thèse Doctorat d'Etat es Sciences naturelles. Univ. Paris VI, 174 p.
- DOROZHKIN, N.A., and KREMNEVA 1976. Effect of temperature and air humidity on the growth and development of the pathogen of Ascochyta blight of pea. *Botanika issled Minsk.*, 18, 181 - 184.
- DURAND, M.C., et SALLE, G. 1981. Effet du tris-0-éthyl phosphate d'aluminium sur le couple *Lycopersicon esculentum* Mill.-*Phytophthora capsici* Leon: Etude cytologique et cytochimique. *Agronomie*, 1, 723 - 732.
- ECHENBRENNER, P., et TAUPIN, P. 1983. Les maladies du Pois *Phytoma*, 346, 34 - 38.
- EHRlich, M.A., and EHRlich, H.H. 1971. Fine structure of the Host-parasite interfaces in mycoparasitism. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 9, 155 - 184.
- ELLINGBOE, A.H. 1968. Inoculum production and infection by foliage pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 6, 317-330.
- EMMANOULLIDIS, I. 1976. Initiation à la pathologie des cultures maraîchères. Institut des Cultures Maraîchères (I.D.C.M.) Alger.
- EMMETT, R.W., and PARBERY, D.G. 1976. Appressoria, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 13, 147 - 167.
- EL-SAMRA, I.A., EL FATTAM, Y.M., and KAMARA, A.M. 1981. Selective induction of infection cushions by *Rhizoctonia solani* in relation to host responses. *Phytopathol. Z.*, 102, 122 - 126.
- EL SHANAWANI, M.Z., and USPENSKAYA, H.D. 1978. Conidiogenesis in fungi of Sphaeropsidales orders (en russe), *Microl. Fitopathol.*, 12, 208 - 211.
- ESKANDARI, F., MEHRI-PRUD'HOMME, H., BERTRANDY, J., et SPIRE, D. 1987. Etude méthodologique en vue d'un diagnostic sérologique permettant la différenciation et l'identification d'*Ascochyta pisi*, *A. pinodes* et *A. pinodella* chez le Pois. 1^{er} Congrès de La S.F.P. Rennes, 19 - 20 Nov.

- FRIC, F. 1976. Oxidative enzymes. In *Physiological Plant Pathology*. Vol. 4 *Encyclopedia of Plant Physiology*. Eds R. HEITEFUSS and P.H. WILLIAMS, SPRINGER-VERLAG Berlin, pp. 617 - 631.
- GATTANI, M.L. 1953. The agar plate spore germination method for testing fungicides. *Phytopathology*, 44, 13 15.
- GLAUERT, M.A., and GLAUERT, R.H. 1958. Araldite as an embedding for electron microscopy, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 191 - 194.
- GOMEZ, G.C., and NICHOLSON, R.L. 1987. Papilla formation and associated peroxydase activity: Anon specific response to attempted fungal penetration of maize, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 31, 51 - 67.
- GOODMAN, R.N., KIRALY, Z., and WOOD, K.R. 1986. *The biochemistry and physiology of plant disease*. University of Missouri. Press. Columbia. 433 p.
- GOSSEN, B.D., SHEARD, J.W., BEAUCHAMP, C.J., and MORRALL, R.A.A. 1986. *Ascochyta lentis* renamed, *Ascochyta fabae* f.sp. *lentis*. *Can. J. Plant Pathol.* 8, 154 160.
- GRAHAM, R.C., and KARNOVSKY, M.J. 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxydase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14, 291 - 302.
- GROVES, W.B. 1967. *British stem and leaf fungi (Coelomycetes)*, Eds WELDON and WESLEY, L.T.T. and STECHERT HAPNER, Service Agency, INC, New York, pp 294 - 312.
- GUILLAUMIN, D. 1980. *La pratique du microscope électronique à balayage en biologie*. Ed. MASSON, Paris 124 p.
- GUILLOT-SALOMON, T., et DOUSSINAULT, G. 1981. Nature des interactions hôte-parasite lors de l'infection par *Cercospora herpotrichoides* Fron de diverses lignées de Triticinées sensibles et résistantes. I. Etude ultrastructurale des tissus au cours de la pathogénèse. *Agronomie*, 1 (4), 277 - 288.

- HADDAD, M. 1981. Etude sérologique de quelques espèces des genres *Ascochyta* Lib., *Colletotrichum corda* et *Phoma* (Fries) Desm. Application au contrôle des semences de Pois. Thèse Doct. Ing. I.N.A. Paris-Grignon, 79 p.
- HALLAM, N.D., and JUNIPER, B.E. 1971. The anatomy of the leaf surface. In Ecology of leaf surface micro-organism. Eds T.F. PREECE and C.H. DICKINSON, Academic Press, pp 3 - 37.
- HAMMERSCHMIDT, R., NUCLES, E.M., and KUC, J. 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant Pathol.*, 20, 73 - 82.
- HAMMILL, T.M. 1972. Fine structure of annellophores, *V. stegonsporium pyriforme*. *Mycologia*, 64, 654 - 657.
- HAMMILL, T.M. 1972. Fine structure of annellophores. II. *Doratomyces manus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 59, 249 - 253.
- HAMMILL, T.M. 1973. Fine structure of annellophores, IV. *Spillocaea pomi*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 60, 65 - 68.
- HAMMILL, T.M. 1974. Electron microscopy of phialides and conidiogenesis in *Trichoderma saturnisporum*. *Amer. J. Bot.*, 61, 15 - 24.
- HAMMILL, T.M. 1977. Transmission electron microscopy of annellides and conidiogenesis in the synnematal hyphomycetes, *Trichurus spiralis*. *Can. J. Bot.*, 55, 233 - 244.
- HANCHEY, P. 1980. Histochemical changes in oat cell walls after victorin treatment, *Phytopathology*, 70, 377 - 381.
- HANCHEY, P., WHEELER H., and LUKE H.H. 1968. Pathological changes in ultrastructure effects of Victorin on oat roots. *Amer. J. Bot.*, 55, 53 - 61.
- HANLIN, R.T. 1976. Phialide and conidium development in *Aspergillus clavatus*. *Amer. J. Bot.*, 63, 144 - 155.
- HARE, W.W., and WALKER, J.C. 1944. *Ascochyta* diseases of canning Pea. *Wis. Agr. Exp. Sta. Res. Bull.*, 150, 1-31.

- HARGREAVES, J.A. 1982. The nature of the resistance of oat leaves to infection by *Pyrenophora teres*. *Physiol. Plant. Pathol.*, 20, 165 - 171.
- HARGREAVES, J.A., and KEON J.P.R. 1986. Cell wall modifications associated with the resistance of cereals to fungal pathogens. In: *Biology and molecular biology of plant pathogen interaction*. Ed. J.A. BAILEY, SPRINGER VERLAG, pp 133 - 140.
- HARROUWER, K.M. 1973. Differential effects of phytoalexin from *Pisum sativum* on two races of *Ascochyta pisi*. *Trans. Brit. Myco. Soc.*, 61, 383 - 396.
- HAWKER, L.E. 1966. Germination: Morphological and anatomical changes. In *the fungus spore*. M.F. MADELIN, Ed. BUTTERWORTHS, LONDON, pp 151 - 163.
- HAYAT, M.A. 1974. Principles and techniques of Scanning Electron Microscopy biological applications, University Park Press Baltimore, 273 p.
- HEATH, M.C. 1982(a). Fungal growth, haustorial disorganisation, and host necrosis in two cultivars of cowpea inoculated with an incompatible race of the cowpea rust fungus. *Physiol. Plant. Pathol.*, 21, 347 - 359.
- HEATH, M.C., 1982(b). The absence of active defence mechanisms in compatible host-pathogen interactions. in *Active Defence mechanisms in plants*, Ed. R.K.S. WOOD, Plenum Pres, pp 149 - 151.
- HEATH, M.C., and WOOD, R.K.S. 1969. Leaf spots induced by *Ascochyta pisi* and *Mycosphaerella pinodes*, *Ann. Bot.* 33, 657 - 670?
- HEATH, M.C., and WOOD, R.K.S. 1971(a) Role of cell wall degrading enzymes in the development of leaf spots caused by *Ascochyta pisi* and *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. Bot.*, 35, 451 - 475.
- HEATH, M.C., and WOOD, R.K.S. 1971(b). Role of inhibitors of fungi growth in the limitation of leaf spots caused by *Ascochyta pisi* and *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. Bot.*, 35, 475 - 491.
- HEITEFUSS, R. 1981. Basic research on host parasite interactions a way for future control measures of plant diseases. *Colloque International sur la Protection des Cultures Tropicales*. Lyon, 8-10 Juillet.

- HEITEFUSS, R., and EBRAHIM-NESBAT F. 1986. Ultrastructural and histochemical studies on mildew of barley (*Erysiphe graminis* DC. f.sp. *hordei* Marchal). *J. Phytopathology*, 116, 358 - 373.
- HENRY, E.W., 1975. Polyphénol oxidase activity in thylakoids and membrane bound granular components of *Nicotiana tabacum* chloroplast, *J. Microscopie Biol. Cell.*, 22, 109 - 116.
- HICKEY, E.L., and COFFEY, M.D. 1977. A fine structural study of the pea downy mildew fungus *Peronospora pisi* in its host *Pisum sativum*. *Can. J. Bot.*, 55, 2845 - 2858.
- HICKEY, E.L., and COFFEY, M.D. 1978. A cytochemical investigation on the host-parasite interface in *Pisum sativum* infected by the downy mildew fungus, *Peronospora pisi*. *Protoplasma.*, 97, 201 - 220.
- HINCH, J.M., and CLARKE, A.E. 1982. Callose formation in zeas as a response to infection with, *Phytophthora cinnamomi*. *Physiol. Plant Pathol.*, 21, 113 - 124.
- HOFFMAN, R.M., and TURNER, J.G. 1982. Partial purification of proteins from pea leaflets that inhibit *Ascochyta pisi* endopolygalacturonase. *Physiol. Plant Pathol.*, 20, 173 - 187.
- HOLLOWAY, P.J. 1971. The chemical and physical characteristics of leaf surfaces. In *Ecology leaf surface micro-organisms*, Eds T.F. PREECE and C.H. DICKINSON, Academic Press 39-53.
- HOSEMANS, D. 1981. Etude de la Rhynchosporiose en microscopie optique et électronique sur différentes variétés d'orge (*Hordeum vulgare* L.) cultivées in vitro. Thèse 3ème cycle, Université Paris XI, Orsay, 55p.
- HOURDRY, J. 1974. Mise en évidence d'une activité phosphatasique acide dans les cellules animales et problèmes posés par cette visualisation. *J. Microscopie.* 21, 245 - 252.
- HUBBELING, N. 1972. Races of *Ascochyta pisi* and testing for resistance in peas. *Eucarpia*, Reunion Pois, 5 - 10 Janvier.
- HUGHES, S.J. 1953. Conidiophores, conidia and classification. *Can. J. Bot.*, 31, 577 - 659.

- HUGHES, J.E., and GUNNING, B.E.S. 1980. Glutaraldehyde induced deposition of callose. *Can. J. Bot.*, 58, 250 - 258.
- INGRAM, D.S., SARGENT J.A., and TOMMERUP, I.C. 1976. Structural aspects of infection by biotrophic fungi. In *Biochemical aspects of plant parasite relationships*, Eds J. FRIEND and R. THRELFALL, Academic Press. pp 43 - 78.
- JEFFREY, C.E., BAKER, E.A., and HOLLOWAY, P.J. 1976. Origins of fine structure of plant epicuticular waxes. In *Microbiology of aerial plant surface*, Eds C.H. DICKINSON and T.F. PEECE, Academic Press, pp 119 - 158.
- JENSEN, W.A. 1962. *Botanical histochemistry: principles and practice*, Eds W.H. FREEMAN and Company, SAN FRANCISCO and LONDON, 408 p.
- JOLY, P., KOLY, F. et BUI-CUC. 1964. Essai d'application de méthodes de traitement numérique des informations systématiques. Etude cinétique de la croissance mycélienne chez les champignons. *Bull. Soc. Mycol. France*.
- JONES, L.K. 1927. Studies of the nature and control by blight, leaf and pod spot, and foot rot of peas caused by species of *Ascochyta*, *N. Y. Agri. Expt. Sta. Bull.*, 547, 1 - 66.
- JONES, J.P. 1976. Ultrastructure of conidium ontogeny in *Phoma pomorum*, *Microsphaeraeopsis olivaceum* and *Coniothyrium fuckelii*. *Can. J. Bot.* 54, 831 - 851.
- JUNIPER, B.F. 1959. The effect of pre-emergent treatment of peas with trichloroacetic acid on the sub-microscopic structure of the leaf surface. *New Phytologist.*, 58, 1 - 4.
- JUNIPER, B.E. 1960. Growth, development, and effect of the environment on the ultrastructure of plant surfaces. *Journal of the Linnean Society (Botany)*: 56, 419 p.
- KAISER, W.J. 1973. Factors affecting growth, sporulation, pathogenicity and survival of *Ascochyta rabiei*. *Mycologia*, 65, 444 - 457.
- KAISER, W.J., and HANNAN, R.M. 1982. Chemical control of *Ascochyta lentis* in infected lentil seed. (Abstr.) *Phytopathology*, 74, 1139 p.

- KAISER, W.J., and HANNAN, R.M. 1986. Incidence of seed borne *Ascochyta lentis* in lentil germ plasm. *Phytopathology*, 76, 355 - 360.
- KARNOVSKY, M.J. 1965. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 27, 137A.
- KENDRICK, W.B., COLE, G.T., and BHATT, G.C. 1968. Conidium ontogeny in hyphomycetes *Gonotobotryum apiculatum* and its botryo-blastospores, *Can. J. Bot.*, 46, 591-596.
- KENDRICK, B. 1971. *Taxonomy of fungi imperfecti*. University of Toronto Press, 309 p.
- KENNING, L.A., HANCHEY, P. 1980. Ultrastructure of lesion formation in *Rhizoctonia* infected bean hypocotyls. *Phytopathology*, 70, 998 - 1008.
- KEON, J.P.R., and HARGREAVES, J.A., 1983. A cytological study of the net blotch disease of barley caused by *Pyrenophora cerealis*. *Physiol. Plant. Pathol.*, 22, 321 - 329.
- KHARBANDA, P.D., and BREWER, C.C. 1980. Cultural and pathogenic variability among isolates of *Ascochyta fabae*. *Can. J. Pathol.*, 2, 139 - 142.
- KIRALY, Z., KLEMENT, Z., SOLYMOSY, F., and VOROS, J. 1974. *Methods in plant Pathology*. ELSEVIER Sc. Publi. Company, LONDON, NEW YORK, 509 p.
- KOG, A.H., MAYANA S., and SHISHIYAMA J. 1980. Correlation between the deposition of fluorescent compound in papillae and resistance in barley against *Erysiphe graminis hordei*. *Can. J. Bot.*, 58, 536 -541.
- KOLATTUKUDY, P.F. 1985. Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 23, 223 - 250.
- KOLATTUKUDY, P.E., and KOLLER, W. 1983. Fungal penetration on the first line defensive barriers of plants. In *Biochemical plant pathology*. Ed. J.A. CALLOW, JOHN WILEY et SONS Ltd. pp 79 - 100.

- KOLLER, W., ALLAN, C.R., and KOLATTUKUDY, P.E. 1981. Role of cutinase and cell degrading enzymes in infection of *Pisum sativum* by *Fusarium solani* f.sp. *pisii*, *Physiol. Plant Pathol.*, 20, 47 - 60.
- KOLLER, W., ALLAN, C.R., and KOLATTUKUDY, P.E. 1982(a). Role of cutinase and cell wall degrading enzymes in infection of *Pisum sativum* by *Fusarium solani* f.sp. *Pisii*. *Physiol. Plant Pathol.*, 20, 47 - 60.
- KOLLER, W., ALLAN, C.R., and KOLATTUKUDY, P.E. 1982(b). Protection of *Pisum sativum* from *Fusarium solani* f.sp. *pisii* by inhibition of cutinase with organophosphorus pesticides. *Phytopathology*, 72, 1425 - 1430.
- KOSUGE, T. 1969. The role of phenolics in host response to infection, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 7, 195 - 219.
- KRITZMAN, G., CHET, I., and GILAN, D. 1981. Spore germination and penetration of *Botrytis allii* into *Allium cepa* host. *Bot. Gaz.*, 142, 151 - 155.
- KSENDZOVA, E.N. 1974. Hydrolytic exo-enzymes of pathogens of Ascochytirosis of pea (in Russe). *Bylleten' Vsesoyuz nogo Nauchno Issle dovate I Skogo Instituta Zashchity Rastenii*, 27, 72 - 74.
- KUNOH, H. 1981. Early stages of infection process of *Erysiphe graminis* on barley and wheat. In *Microbial ecology of the phylloplane*, Ed. J.P. BLAKEMAN, Academic Press, pp 85-101.
- KUNOH, H., KUNOH, M., and ISHIZAKI, H. 1985. Cytological studies on the early stage of powdery mildew in barley and wheat, *Can. J. Bot.*, 63, 1525 - 1539.
- KUNOH, H., KUNOH, M., TASHIRO, S. and ISHIZAKI, H. 1979. Studies of the powdery mildew fungus *Leveillula taurica*, on green pepper. II. Light and electron microscopic observation of the infection process, *Can. J. Bot.*, 57, 2501 - 2508.
- KUNOH, H., TSUZUKI, T. and ISHIZAKI, H. 1978. Cytological studies of early stages of powdery mildew in barley and wheat. IV. Direct ingress from superficial primary germ tubes and appressoria of *Erysiphe graminis hordei* on barley leaves. *Physiol. Plant Pathol.*, 13, 327 - 333.

- KUNOH, H., YAMAMORI K., and ISHIZAKI, H. 1982. Cytological studies of early stages of powdery mildew in barley and wheat. VIII Autofluorescence at penetration sites of *Erysiphe graminis hordei* on living barley coleoptiles. *Physiol. Plant Pathol.*, 21, 373 - 379.
- LAMOTTE, M. 1967. Initiation aux méthodes statistiques en biologie. MASSON et Cie, Ed. Paris, pp 6 - 7.
- LAPP, M.S., and SKOROPAD, W.P. 1978. Nature of adhesive material of *Colletotrichum graminicola* appressoria. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 70, 221 - 223.
- LAZAROVITS, G., and HIGGINS, V.J. 1976. Ultrastructure of susceptible, resistant and immune reaction of tomato to races of *Cladosporium fulvum*. *Can. J. Bot.*, 54, 235-249.
- LEACH, CM. 1962. The quantitative and qualitative relationship of U.V. and visible radiation to the induction of reproduction in *Ascochyta pisi* Lib., *Can. J. Bot.*, 40, 1577-1602.
- LEBEDA, A. 1984. A contribution to the general theory of host-parasite specificity. *Phytopath. Z.*, 10, 226 - 234.
- LE POIVRE, P. 1981. Effet de l'ascochitine sur les protoplastes de *Pisum sativum*. *Bull. Rech. Agro. Gembloux*, 16, 27-34.
- LE POIVRE, P. 1982. Sensibility of pea cultivars to ascochyte and possible role of the toxin in the pathogenicity of *Ascochyta pisi* Lib. *Phytopath. Z.*, 103, 25 - 34.
- LE POIVRE, P., and NKINKI, B. 1983. Effect of pea lectin on the infection of pea by *Mycosphaerella pinodes* (Berk. and Blox.) Vesterg. *Parasitica*, 39, 145 - 149.
- LIMASSET, P., et DARPOUX, H. 1951. Principes de pathologie 2ème Ed. DUNOD, Paris. 334 p.
- LDUNIS, R. 1982. Contribution à l'étude de l'antracnose du Pois en Algérie. *Mémoire Ing. I.N.A. El-Harrach Alger*, 96 p.
- LUMSDEN, R.D. 1979. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69, 890 - 896.
- McKEEN, W.E., 1974. Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 64, 461 - 467.

- McKEEN, W.E., and RIMMER, S.R. 1973. Initial penetration process in powdery mildew infection of susceptible barley leaves. *Phytopathology*, 63, 1014 - 1053.
- McKEEN, W.E., and SVIRGEV 1981. Early development of *Peronospora tabacina* in the *Nicotiana tabacum* leaf. *Can. J. Plant Pathol.*, 3, 145 - 158.
- MACNAMARA, O.C., and DICKINSON, C.H. 1981. Microbial degradation of plant cuticle. In *Microbial ecology of the phylloplane* Ed. J.P. BLAKEMAN, Academic Press, pp 455 - 473.
- MADHOSINGH, C., and WALLEN, V.R. 1968. Serological differentiation of the *Ascochyta* species on peas, *Can. J. Microbiol.*, 14, 449 - 451.
- MAITI, I.B., and KOLATTUKUDY, P.E. 1979. Prevention of fungal infection of plants by specific inhibition of cutinase, *Science*, 2, 507 - 508.
- MANNERS, J.G., 1966. Assesement of germination. In "the fungus spore" Ed. M.F. MADELIN. BUTTERWORTHS, pp 165 - 174.
- MANSFIELD, J.W., 1982. The role of phytoalexins in disease resistance. In *Phytoalexins*, Eds J.A. BAILEY and J.W. MANSFIELD BLACKIE, GLASGOW, pp 253 - 282.
- MANSFIELD, J.W. 1983. Antimicrobial compounds. In *Biochemical plant pathology*, Ed. J.A. CALLOW. JOHN WILEY and SONS Ltd, pp 237 - 266.
- MANSFIELD, J.W., and HUTSON, R.A. 1980. Microscopical studies on fungal development and host responses in broad bean and tulip leaves inoculated with five species of *Botrytis*. *Physiol. Plant Pathol.*, 17, 131 - 144.
- MANSFIELD, J.W., and RICHARDSON, A. 1981. The ultrastructure of interactions between *Botrytis* species and broad bean leaves. *Physiol. Plant Pathol.*, 19, 41 - 48.
- MARSHALL, D.S., and RUSH, M.C. 1980. Infection cushion formation on rice sheaths by *Rhizoctonia solani* *Phytopathology*, 70, 947 - 950.
- MARSHALL, D.S., and RUSH, M.C. 1980. Relation between infection by *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* and disease severity in rice. *Phytopathology*, 70, 941 - 946.

- MARTIN, J.T. 1964. Role of cuticle in the defence against plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 2, 81 - 100.
- MARTIN, BLATT, and BURCHILL 1957. Fungistatic properties of apple leaf wax. *Nature*, 1980, 796 - 797.
- MARTIN, R.D., SAMUELSON, D.A., and FREEMAN, T.E. 1979. Ultrastructural localisation of polyphenoloxidase activity in leaves of healthy and diseased Waterhyacinth. *Phytopathology*, 69, 1278 - 1287.
- MASRI, S.S., and ELLINGBOE, A.H. 1966. Primary infection of wheat and barley by *Erysiphe graminis*. *Phytopathology*, 56, 389 - 395.
- MATHUR, R.S., BARNETT, H.L., and LILLY, V.G. 1950. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. *Phytopathology*, 40, 104 - 114.
- MAXWELL, D.P., ARMENTROUT, V.N., and GRAVES, L.B. 1977. Microbodies in plant pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 15, 119 - 134.
- MAUDE, R.B. 1965. Pea seed infection by *Mycosphaerella pinodes* and its control by seed soaks in thiram and captan suspension, *Ann. Appl. Biol.*, 57, 197 - 200.
- MAUDE, R.B., and KYLE, A.M. 1970. Seed treatments with benomyl and other fungicides for the control of *Ascochyta pisi* on peas, *Ann. Appl. Biol.*, 66, 37 - 41.
- MCCOY, M.S., and ELLINGBOE, A.H. 1966. Major genes for resistance and the formation of secondary hyphae by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Phytopathology*, 56, 683 - 686.
- MENGHDEN, K. 1975. Ultrastructural demonstration of different peroxydase activities during the bean rust infection process. *Physiol. Plant. Pathol.*, 6, 275 - 282.
- MENGHDEN, K., and FUCHS, W.H. 1973. Electron microscopy demonstration of peroxydases activities in *Phaseolus vulgaris* after infection with *Uromyces phaseoli* *typica*. *Arch. Mikrobiol.*, 88, 181 - 182.

- MERCER, P.C., WOOD, R.K.S., and GREENWOOD, A.D. 1971. Initial infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. In Ecology of Leaf surface micro-organisms, Eds T.F. PREECE and C.H. DICKINSON, Academic Press, London, pp 381 - 389.
- MERCER, P.C., WOOD, R.K.S., and GREENWOOD, A.D. 1975. Ultrastructure of the parasitism of *Phaseolus vulgaris*, *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Plant Pathol.*, 5, 203 - 214.
- MESSIAEN, C.M. 1955. Sur quelques anthracoses des plantes cultivées. *Ann. Epiphyties*, 3, ---
- MESSIAEN, C.M. 1981. Les variétés résistantes: Méthode de lutte contre les maladies et ennemis des plantes. INRA, France, 374 p.
- MESSIAEN, C.M., et LAFON, R. 1963. Les maladies des plantes maraichères. Ed. INRA (France).
- MILLER, S.A., and MAXWELL, D.P. 1984. Ultrastructure of susceptible, host resistant, and nonhost resistant interactions of alfalfa with *Phytophthora megasperma*. *Can. J. Bot.*, 62, 117 - 128.
- MINTHER, D.W., KIRK, P.M., and SUTTON, B.C. 1982. Holoblastic phialides, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 79, 75 - 93.
- MINTER, D.W., KIRK, P.M., and SUTTON, B.C. 1983. Thallic phialides, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 80, 39 - 66.
- MISAGHI, I.G. 1982. Physiological and biochemistry of plant pathogen interactions, Plenum Press, New York, London, 287 p.
- MOHAMMEDI, S. 1984. Etude du comportement biologique et pathologique de certaines espèces d'*Ascochyta* sur certaines espèces légumineuses. Mémoire Ingénieur I.N.A. El-Harrach Alger, 81 p.
- MOUNT, M.S., and SLESINSKI, R.S. 1971. Characterization of primary development of powdery mildew. In Ecology of Leaf surface Microorganisms, Eds T.F. Preece and C.H. DICKINSON, Academic Press pp 301 - 322.
- MOREAU, F. 1953. Les champignons. *Encyclopedie Mycologique*, Ed. Paul LECHEVALIER, Paris, 2120 p.

- MORGAN JOHNES, G., NAG RAJ, T.R., and KENDRICK, B. 1972. Conidium ontogeny in Coelomycetes: IV. Percurrently proliferating phialides. *Can. J. Bot.*, 50, 2009-2014.
- MUELLER, W.C., and BECKMAN, C.H. 1978. Ultrastructural Localisation of polyphenoloxylase in roots and hypocotyls of cotton seedlings, *Can. J. Bot.*, 56, 1579.- 1587.
- NEERGARD, P. 1973. Detection of seed-borne pathogens by culture tests. *Seed Sci. and Technol.*, 1, 217 - 254.
- NEERGARD, P. 1977. Seed pathology. The Macmillan Press, London, 1100 p.
- NOUGAREDE, A., et PILET, P.E. 1967. Activité et localisation au niveau des infrastructures de la phosphomonesterase acide dans la racine et les jeunes feuilles de *Lens culinaris*. *C.R. Acad. Sci. D.*, 265, 663 - 666.
- NOUGAREDE, A. 1969. Biologie I. Cytologie. MASSON et Cie, Paris, 598 p.
- NOVIKOFF, A.B. 1968. Ultrastructural and cytochemical observations on B-16 and Harding-passey mouse melanomas. The origin of permelanosomes and compound melanosomes. *J. Histochem.*, 16, 299 - 319.
- O'CONNELL, R.J., and BAILEY, J.A. 1986. Cellular interactions between *Phaseolus vulgaris* and the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. In: *Biology and molecular biology of plants - pathogen interactions*. Ed. J. A. BAILEY, SPRINGER-VERLAG, pp 39 - 49.
- O'CONNELL, R.J., BAILEY, J.A., and RICHMOND, D.V. 1985. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Plant Pathol.*, 27, 75 - 98.
- OKU, H., and NAKANISHI, T. 1963. A toxin metabolite from *Ascochyta fabae* having antibiotic activity. *Phytopathology*, 53, 1321 - 1325.
- ONDEREJ, M. 1968. Príspevek k poznani fytopatogen nich imperfektnich hub rodu *Ascochyta* (Lib.) Sacc. na Leguminozách. *Biologia, Bratisl.*, 23, 308 - 818.

- PARBERRY, D.G. 1981. Biology of anthracoses on leaf surfaces. In *Microbial Ecology of the Phylloplane*. Ed. J.P. BLACKEMAN. Academic Press, pp 135 - 154.
- PATYKOWSKI, J., URBANEK, H., and KACZOROSKA, T. 1988. Peroxidase activity in leaves of wheat cultivars differing in resistance to *E. graminis*. *J. Phytopathology*, 122, 126 - 134.
- PEREZ, R., et CATESSON, A.M. 1982. Lignification du parenchyme vasculaire du Radis en survie, évolution ultrastructurale et activités perxydasiques pariétales. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 4, 169 - 188.
- POLITIS, D.J., and WHEELER, H. 1973. Structural study of penetration maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. *Physiol. Plant. Pathol.*, 3, 465 - 471.
- PERSON, L.H. 1961. A method of maintaining viability and ability to sporulate in isolates of *Ascochyta*. *Phytopathology*, 51, 797 - 798.
- POUX, N. 1963. Sur la présence d'enclaves cytoplasmiques en voie de dégénérescence dans les vacuoles des cellules végétales. *C.R. Acad. Sc.*, 257, 736 - 738.
- POUX, N. 1969. Localisation d'activités enzymatiques dans les cellules du méristème radiculaire de *Cucumis sativus* : activité peroxydasique. *J. Microscopie*, 8, 855 - 866.
- POUX, N. 1970. Localisation d'activités enzymatiques dans le méristème radiculaire de *Cucumis sativa*. III. Activité Phosphatasique acide. *J. Microscopie*, 9, 407-434.
- POUX, N. 1974. Localisation des activités phosphatasiques acides et peroxydases au niveau des ultrastructures végétales. *J. Microscopie*, 21, 265 - 274.
- PRING, R.J. 1980. A fine structural study of the infection of leaves *Phaseolus vulgaris* by uredospores of *Uromyces phaseoli*. *Physiol. Plant Pathol.*, 17, 269 - 276.
- PUNITHALINGHAM, E. 1979. Graminicolous *Ascochyta* species. *Mycol. Pap.*, 142, 1 - 214.
- PUNITHALINGHAM, E., and HOLLIDAY, P. 1972. Description of pathogens fungi and Bacteria, N° 334, 337, 340, 461. Commonwealth Agricultural Institute. England.

- PUNITHALINGHAM, E., and HOLLIDAY, P. 1975. C.M.I. descriptions of pathogenic fungi and bacteria N° 461, 518, 340, 334. Commonwealth Mycological Institute, Surrey, England.
- RAPILLY, F. 1968. Techniques de Mycologie en Phytopathologie Végétale. Ann. Epiphyties, 19, Hors série.
- RAPILLY, F., et SKAJENNIKOFF, M. 1974. Etude sur l'inoculum de *Septoria nodorum*, Agent de la septoriose du Blé. Ann. Phytopathol., 6, 71 - 82.
- RAYNAL, G. 1972. Contribution à l'étude de *Colletotrichum Dast*, champignon parasite du Cotonier. Thèse 3ème Cycle, Fasc. Sc. Univ. Paris Sud. 60 p.
- RAYNAL, G. 1983. Contribution à l'étude des mycoses de la Luzerne et du Trèfle. Cas de 3 maladies nécrotiques: anthracnoses, pepper-spoot, sclerotinioses. Possibilités de lutte. Thèse Doctorat d'Etat es Sciences Naturelles. Université Paris Sud ORSAY. 239 p.
- READ, H.D., PORTER, R., and BECKETT, A. 1983. A comparison of preparative techniques for the examination of the external morphology of fungal material with the scanning electron microscope. Can. J. Bot., 61, 2059-2078.
- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of leaf citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 17, 208 - 212.
- RICHARDSON, M.J. 1979. An annotated list of seed borne diseases. Third Edition supplement 1 et 2 Commonwealth Mycological Institute and International Seed Testing Association, 320 p.
- RIDE, J.P. 1983. Cell walls and others structural barriers in Defence. In Biochemical Plant Pathology. Ed. J.A. CALLOW, JOHN WILEY et SONS Ltd, pp 215 - 235.
- RIDE, J.P., and PEARCE, R.B. 1979. Lignification and papilla formation at sites of attempted penetration of wheat leaves by non pathogenic fungi. Physiol. Plant Pathol., 15, 79 - 92.
- RIDE, J.P. 1985. Non host resistance to fungi. In Mechanisms of resistance to plant disease. Ed. R.S.S. FRASER, MARTINUS NIJHOFF / Dr W. JUNK Publishers, pp 29 - 61.

- RIJKENBERG, F.H., De LEEUN G.T.N., and VERHOFF, K. 1980. Light and electron microscopy studies on the infection of tomato fruits by *Botrytis cinerea*. *Can. J. Bot.*, 58, 1394 - 1404.
- ROBINOW, C.F. 1961. Mitosis in the yeast *Lipomyces lipofer*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 879 - 892.
- ROGER, L. 1953. *Phytopathologie des pays chauds*. Ed. Paul LECHEVALIER, Paris, T. 2, 1724 - 1725.
- ROLAND, J.C., et SANDOZ D. 1969. Détection cytochimique des sites de formation des polysaccharides pré-membranaires dans les cellules végétales. *J. Microscopie*, 8, 263-268.
- ROLAND, J.C. 1974. Cytochimie des polysaccharides végétaux: détection et extraction sélectives. *J. Microscopie*, 21, 233 - 244.
- ROQUEBERT, M.F. 1981. Conidiogénèse et conidiophores chez *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link ex S.F. Gray et *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) De vries *Cryptog. Mycol.*, 2, 269 - 277.
- ROQUEBERT, M.F. 1977. Structure et signification du col des phialides. *Rev. Mycol.*, 41, 207 - 222.
- ROQUEBERT, M.F., et FAYRET J. 1982. *Marsoniella juglandis* anamorphe de *Gnomonia leptostyla*. *Can. J. Bot.*, 60, 1320 - 1329.
- ROUGIER, M. 1972. Etude cytochimique des squamules d'*Elodea canadensis*. Mise en évidence de leur sécrétion polysaccharidique et de leur activité phosphatasique acide. *Protoplasma*, 74, 113 - 131.
- ROYLE, D.J. 1976. Scanning electron microscopy of plant surface micro-organisms. In *Microbiology of aerial plant surface*. Eds C.H. DICKINSON and T.F. PREECE, Academic Press, pp 569 - 605.
- RUSSO, S.M., and PAPELIS, A.A. 1981. Observations of *Colletotrichum circinans* on *Allium cepa*: halo formation and penetration of epidermal walls. *Physiol. Plant Pathology*, 19, 127 - 136.
- SABATINI, D.C., BENSCH, K., and BARNETT, R.J. 1963. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell. Biol.*, 17, 19 - 58.

- SAHNOUN, F. 1977. Contribution à l'étude du comportement de différents fongicides utilisables en désinfection des semences de Pois contre *Ascochyta pisi* Lib. Mémoire Ing. I.N.A. El-Harrach Alger, 76 p.
- SALLE, G. 1977. Etude cytologique - cytochimique et histoautoradiographique du *Viscum album* L. (Loranthacées) I. la graine, sa germination et les modalités de la fixation sur l'hôte. Rev. Cyto. Biol. Végét., 38, 1 - 110.
- SARGENT, J.A., TOMMERUP, I.C., and INGRAM, D.S. 1973. The penetration of a susceptible lettuce variety by the downy mildew fungus *Bremia lactuca*^c. Physiol. Plant Pathol., 3, 231 - 239.
- SARGENT, C., et GAY, J.L. 1977. Barley epidermal apoplast structure and modification by powdery mildew contact. Physiol. Plant Pathol., 11, 195 - 205.
- SATTAR, A. 1932. A comparative study of the fungi associated with blight diseases of certain cultivated leguminous plants. Trans. Br. Mycol. Soc., 18, 276 - 301.
- SCHRANTZ, J.P., 1979. Cytochimie et ultrastructure des parois mélanisées de l'*Anthrachyba maurilabra* (COOKE) BOND. (Discomycetes) naturel et en culture. Rev. Cytol. Végét. Bot., 2, 309 - 327.
- SEXTON, 1971. A study of the biochemistry and cytochemical localisation of glycerophosphatase activity in root tips of maize and pea. Protoplasma. 73, 417 - 441.
- SHAYKH, M., SOLIDAY, C., and KOLATTUKUDY, P.E. 1977. Proof for the production of cutinase by *Fusarium solani* f.sp. *psii* during penetration in to its host, *Pisum sativum*. Plant Physiology, 60, 170 - 172.
- SHERIDAN, J.A. 1981. The pathogenicity to peas of *Mycosphaerella pinodes* and *Ascochyta pisi* in cut away peat and mineral soil. Ir. J. Agric. Res., 20, 201 - 209.
- SHERWOOD, R.T., and VANCE, C.P. 1976. Histochemistry of papillae formed in red canary grass leaves in response to noninfecting pathogenic fungi. Phycopathology, 66, 510 - 563.
- SHERWOOD, R.T., and VANCE, C.P. 1980. Resistance to fungal penetration in Gramineae. Phycopathology, 70, 273-279.

- SINGH, K.D., REDDY, M.V., and NENE, Y.L. 1981. Sources of resistance to gram blight and grey mold. International chickpea Newsletter, 4, 16 - 17..
- SKIPP, R.A., and DEVERALL, B.J. 1972. Relationships between fungal growth and host changes visible by light microscopy during infection of bean hypocotyls (*Phaseolus vulgaris*) susceptible and resistant, to physiological races of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Plant Pathol.*, 2, 357 - 374.
- SKOLKO, A.J., GROVES, J.W., and WALLEN, V.R. 1954. Diseases of peas in Canada with special references to seed transmission. *Can. J. Agr. Sci.*, 34, 417 - 428.
- SOMMER, J.R., and BLUM, J.J. 1965. Cytochemical localisation of acid phosphatase in *Englena gracilis*. *J. Cell. Biol.*, 24, 235 - 251.
- SPRAGUE, R. 1929. Host range and life history studies of some leguminous *Ascochyta*. *Phytopathology*, 19, 917 - 932.
- STABELY, J.R., PILLAT, A., and HANSON, E.W. 1969. Electron microscopy of the development of *Erysiphe polygoni* in resistant and susceptible *Trifolium pratense*. *Phytopathology*, 59, 1668 - 1683.
- STEINKAMP, M.P., 1979. Ultrastructure of lesions produced by *Cercospora beticola* in leaves of *Beta vulgaris*. *Physiol. Plant Pathol.*, 15, 13 - 26.
- STOCKWELL, V. and HANCHEY, P. 1983. The role of the cuticle in resistance of beans to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 73, 1640 - 1642.
- STOSSEL, P., LAZAROVITS, G., and WARD, E.W.B. 1980. Penetration and growth of compatible and incompatible races of *Phytophthora megasperma* var. *Sojae* in Soybean hypocotyl tissue differing in age. *Can. J. Bot.*, 58, 2594 - 2601.
- STOSSEL, P., LAZAROVITS G., and WARD, E.W.B. 1981(a). Differences in the mode of penetration of soybean hypocotyls by two races of *Phytophthora megasperma* var. *Sojae*. *Can. J. Bot.*, 59, 1117 - 1119.

- STOSSEL, P., LAZAROVITS, G., and WARD, E.W.B. 1981(b). Electron microscopy study of race specific and age-related resistant and susceptible reactions of soybeans to *Phytophthora megasperma* var. *Sojae*. *Phytopathology*, 71, 617 - 623.
- SUBRAMONIAN, C.V. 1972. Conidium ontogeny. *Curr. Sci.*, 41, 619 - 624.
- SUSURI, L. 1976. Contribution à l'étude de quelques caractéristiques d'*Ascochyta blight* Lib., pathogène du Pois en Yougoslavie. *Zast. Bilja, Jugosl.*, 37, 69 - 87.
- SUTTON, B.C. 1973. Coelomycetes in the fungi. Eds G.C. AINSWORTH, F.K. SPARROW and A.S. SUSSMAN, Vol 4 A, Academic Press, New York, pp 513 - 591.
- SUTTON, B.C. 1980. The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- SUTTON, B.C., and SANDHU, D.K. 1969. Electron microscopy of conidium development and secession in *Cryptosporiosis* sp, *Phoma fumosa*, *Melanconium bicolor* and *M. aplocarpum*. *Can. J. Bot.*, 47, 745 - 749.
- SZJNBERG, 1973. Effect of surfaces was on inhibition of germination of *Botrytis cinerea* spores on beet root leaves. *Physiol. Plant Pathol.*, 3, 269 - 278.
- TEPPER, C.S., and ANDERSON, A.J. 1984. The genetic basis of plant pathogen interaction. *Phytopathology*, 74, 1143 - 1145.
- TESSIER, D., et BERRIER, J. 1979. Utilisation de la microscopie électronique à balayage dans l'étude des sols.
- THIERY, J.P., 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie*, 6, 987 - 1018.
- TOUZE, A. 1964. L'antracnose du Melon: Etude de quelques manifestations physiologiques. Thèse Doctorat d'Etat, Toulouse, 122 p.

- YOSHIKAWA, M. 1983. Macromolecules recognition, and the triggering of resistance. In Biochemical Plant Pathology. Ed J.A. CALLOW, John WILEY and SONS Ltd, pp 267 - 298.
- ZARACOVITS, C., 1966. The germination in vitro of conidia of powdery mildew fungi. In the fungus spore. Ed. by M.F. MADELIN-BUTTERWORTHS.
- ZEE, S.Y., 1969. The localisation of acide phosphatase in the sieve element of Pisum. Austral. J. Biol. Sc., 22, 1051 - 1054.
- ZYEN, R.J., and BUSHNELL, W.R. 1979. Papilla response of barley epidermal cells caused by Erysiphe graminis rate and method of deposition determined by microcinematography and transmission electron microscopy. Can. J. Bot., 57, 898 - 913.

