

Ecole Nationale Supérieure Agronomique

(ENSA) El Harrach – Alger



Thèse de DOCTORAT

Présentée et soutenue le 31 juillet 2019

par

Djida AYAD

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

Spécialité Biotechnologie appliquée à la Phytopathologie

Recherche sur les agents responsables de l'Alternariose de la pomme de terre et de la tomate en Algérie. Analyse comparative de leur diversité phénotypique et génotypique selon les systèmes de culture et les étages bioclimatiques.

Devant le jury

M. Lakhdar KHELIFI	Professeur (ENSA) El Harrach	Président
M. Zouaoui BOUZNAD	Professeur (ENSA) El Harrach	Directeur de thèse
M. Philippe SIMONEAU	Professeur (Université d'Angers) France	Co-directeur de thèse
Mme. Meriem LOUANCHI	Professeur (ENSA) El Harrach	Examinatrice
M. Messaoud BEN CHABANE	Professeur (Université Saad Dahlab) Blida	Examineur
M. Benali SETTI	Professeur (Université Hassiba Ben Bouali) Chlef	Examineur

Année universitaire : 2018-2019

Avant-propos

Ce mémoire de thèse déposé à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) d'El Harrach à Alger, résume le travail que j'ai réalisé depuis Décembre 2012.

Cette thèse a été financée par un programme de bourse doctorale PROFAS B+ qui m'a permis de confirmer mon désir d'enseigner pour mon projet professionnel futur. C'est en Février 2015 que j'ai eu le privilège de réaliser mes travaux de recherche à l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS) à l'université d'Angers en France au sein de l'équipe de recherche FungiSem en collaboration avec SFR QUASAV.

Ces travaux de recherche ont donné lieu à la rédaction de deux notes (premières signalisations), un article publié, trois communications orales lors des congrès internationaux ainsi qu'à la présentation de deux posters et à l'encadrement de plusieurs mémoires d'ingénieurs et de masters.

Cette thèse a pour but de présenter mon activité de recherche conduite durant mes travaux de thèse. Pour cela, une synthèse bibliographique présentant le contexte de l'étude a été rédigée dans un premier chapitre. Suite à cette introduction, les différents aspects étudiés au cours de cette thèse ont été traités séparément pour ensuite être confrontés dans un dernier chapitre associé à une discussion générale. La fin du manuscrit est consacrée aux perspectives qui émergent des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse.



Remerciements

Le temps des remerciements me permet de faire le point sur ces multiples années passées dans le laboratoire de mycologie à l'ENSA (en tenant compte d'ingénieur et magister que j'ai effectués dans cette même structure). D'une manière assez générale, j'ai pu acquérir énormément d'expérience professionnelle et également gagné en maturité d'un point de vue plus personnel. Je garde de mon vécu dans ce laboratoire des instants de ma vie réellement enrichissante, qui m'ont vraiment étaient bénéfiques dans la vie.

Ma première incursion dans le laboratoire a été marquée par ma rencontre avec monsieur Abdelaziz KEDAD, pour mon entretien de stage de préparation de mémoire d'ingénieur (sur les sclerotinioses). Je tenais tout d'abord à vous remercier de l'accueil et de la disponibilité dont vous avez pu faire preuve aussi au cours de mes travaux de recherches sur les *Alternaria* spp. Je vous remercie pour votre soutien et votre aide dans la construction de la structure scientifique de la thèse, où vos suggestions, critiques et commentaires ont été un atout professionnel et précieux pour moi. J'ai pu, grâce à vous, évoluer dans le domaine de la mycologie. J'ai vraiment apprécié votre compagnie et c'est en partie grâce au stage de mémoire d'ingénieur avec vous sur les sclerotinioses que j'ai concrètement découvert et aimé la phytopathologie.

Mes remerciements s'adressent aussi à monsieur Arezki MEKLICHE pour son aide sur les analyses statistiques.

Je ne remercierai jamais assez Mohamed KERKOUUD, grâce à toi, j'ai pu envisager mon travail de thèse avec Phillipe SIMONEAU dans le laboratoire de l'IRHS à l'université d'Angers. Merci encore et bon courage dans la suite de tes recherches.

Mon arrivée à l'université d'Angers a été marquée par ma rencontre avec Pascal POUPARD. Je tenais à te remercier de l'accueil et de la disponibilité dont tu as pu faire preuve au cours de mon séjour scientifique au laboratoire. J'ai pu, grâce à toi, évoluer dans les meilleures conditions sans me tracasser des joies de la paperasse administrative. Merci encore Pascal.

Je remercie tous les membres de l'équipe Fungisem pour leur coopération, je tenais à remercier particulièrement Bruno HAMON qui a été d'un soutien inestimable pour chaque expérimentation que j'ai pu faire. Ainsi que Sylvie LECLERC de SFR QUASAV pour l'accueil et la précieuse aide concernant l'incubateur NUV. Merci à vous deux pour votre sérieux au travail et à votre grande disponibilité. Je remercie également Nelly BATAILLE-SIMONEAU pour m'avoir guidé sur certains protocoles de laboratoire. Je n'oublie jamais les meilleurs moments passés au laboratoire avec Elodie BELMAS et Julia COURTIAL qui ont soutenues leurs thèses bien avant moi et tant mieux pour vous après une grande période de pression et de stress !

Enfin viennent les remerciements adressés à mes superviseurs, Zouaoui BOUZNAD et Philippe SIMONEAU. Je pense que ma gratitude ne saurait compenser les efforts que vous avez faits pour moi.

Philippe, je te remercie de ton accueil et ton suivi dès mon arrivée dans ton laboratoire. Je te remercie pour ton inspiration, ton amitié et tes encouragements. Tout au long de mes recherches, tu m'as fourni une excellente vision scientifique, où tu as toujours été là pour me guider, me critiquer et m'aider, sans tes conseils il était impossible de réaliser ce projet. J'apprécie ton intelligence, ta façon d'analyser et de penser, qui m'ont beaucoup influencé. Je te suis réellement reconnaissante pour tous ce que tu as pu faire pour moi et mes travaux de thèse notamment pour mes publications en particulier le dernier article ! Faut dire que sans toi je ne pense pas pouvoir envisager la soutenance de ma thèse ! Tu m'as motivé, encouragé et aidé et sans toi cela n'aurait sans doute pas été possible. Merci pour tout !

Enfin, je tenais à vous remercier monsieur BOUZNAD pour m'avoir permis, d'une part de faire ma thèse à l'ENSA et d'autre part d'avoir su gérer mes tendances à travailler en parallèle. J'ai pu grâce à vous, suivre le chemin que je désirais tout au long de cette thèse, c'est-à-dire améliorer mes compétences en phytopathologie et également développer de nouvelles compétences en biotechnologie.

Mes remerciements vont aussi à monsieur Lakhdar KHELIFI qui a accepté de présider ma soutenance ; Madame Meriem LOUANCHI, messieurs Benali SETTI et Messaoud BEN CHABANE d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je n'oublie pas ma chère famille qui m'a accompagnée, soutenue et motivée tout au long de cette thèse avec leur prières et encouragements.

“Parce que la **science** nous balance sa **science**, **science** sans conscience égale **science** de l'inconscience.”



SCIENTIFIC PRODUCTIONS OF THE THESIS

Published in international peer reviewed journals

1. AYAD D., ARIBI D., HAMON B., KEDAD A., BOUZNAD Z., SIMONEAU P. 2019. « **Distribution of large-spored *Alternaria* species associated with potato and tomato early blight according to hosts and bioclimatic regions of Algeria** ». *Phytopathologia Mediterranea* 58(1) : 139-149.
2. AYAD D., HAMON B., KEDAD A., BOUZNAD Z., SIMONEAU P. 2018. « **First report of early blight caused by *Alternaria linariae* on potato in Algeria** ». *Plant Disease*. 2018. Vol. 102 n°12 p. 2651
3. AYAD D., LECLERC S., HAMON B., KEDAD A., BOUZNAD Z., SIMONEAU P. 2017. « **First report of early blight caused by *Alternaria protenta* on potato in Algeria** ». *Plant Disease*. 2017. Vol. 101 n°5 p. 836
4. Ayad D., A. Mansouri, Y. Moulay, A. Kedad and Z. Bouznad, 2015. **Early blight of potato and tomato in Algeria : Importance of disease and phenotypic diversity of pathogenic species**. *Phytopathologia Mediterranea* (2015) 54, 1, 140–196.

Presented in the conferences/seminars

5. AYAD D., HAMON B., KEDAD A., SIMONEAU P., BOUZNAD Z. 2018. « **New data on early blight of potato caused by a complex of large-spored *Alternaria* species in Algeria** ». In : *16th Congress of Euroblight*. 9-14 mai, Aarhus.
6. Ayad D., Leclerc S., Hamon B., Simonneau F., Kedad.A, Simoneau P., Bouznad Z. 2016. **Morphological and Molecular characterization of large-spored *Alternaria* species associated with Early Blight of potato and tomato in Algeria**. *8th Days PhD SPE from 29 June to 1 July 2016 at the Museum of Toulouse*.

7. AYAD D., A. MANSOURI, Y. MOULAY, A. KEDAD, Z. BOUZNAD. 2015. **Earlyblight of potato and tomato in Algeria : Importance of disease and phenotypic diversity of pathogenic species.** *Joint International Congress. 14th Congress of Mediterranean Phytopathological Union. International Society of Mycotoxicology (Mediterranean Branch) 25-29 August 2014 Istanbul, TURKEY. Publication des proceedings*

Poster presented

8. AYAD D., LECLERC S., HAMON B., MILIEN M., KEDAD A., SIMONEAU P., BOUZNAD Z. 2016. « **Large-spored *Alternaria* species responsible for early blight on potato and tomato in Algeria** ». In : *11e Colloque National de la Société Française de Biologie Végétale*. 6-8 juillet 2016, Angers.

Dédicaces

Aux deux lions de ma vie,

mon papa M'hamed & mon fils Mehdi

... Courage, espoir et confiance en soi sont les
prémises puissantes d'un fondement véhiculaire
de la voie de la réussite...

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Phylogénie des sections des <i>Alternaria</i> spp. basée sur les séquences des gènes GAPDH, RPB2 and TEF1 (D’après Woudenberg <i>et al.</i> , 2014).....	14
Figure 2	Phylogénie des sections des <i>Alternaria</i> spp. (D’après Lawrence <i>et al.</i> , 2016).....	15
Figure 3	Quelques symptômes de l’alternariose de la pomme de terre et de la tomate.....	17
Figure 4	Cycle de l’alternariose de la tomate et de la pomme de terre	18
Figure 5	Localités géographiques dans les différentes zones bioclimatiques.....	31
Figure 6	Semis des variétés de pomme de terre et de tomate.....	43
Figure 7	Inoculation artificielle croisée.....	46
Figure 8	Echelle de notation visuelle de la sévérité de l’alternariose	46
Figure 9	Evaluation de la croissance mycélienne.....	50
Figure 10	Mesure de la croissance des hyphes par néphélométrie.....	52
Figure 11	Amplifications avec le couple d’amorce ITS1/ITS4.....	56
Figure 12	PCR spécifique d’identification d’ <i>A.solani</i> et <i>A.grandis</i>	57
Figure 13	PCR spécifique d’identification d’ <i>A.linariae</i>	57
Figure 14	Profil d’ <i>Alternaria</i> spp. Sur le logiciel Serial Cloner 2-5.....	59
Figure 15	Profil de PCR RFLP et la double digestion	60
Figure 16	Arbre phylogénétique reconstruit à partir de l’alignement de séquence de calmoduline de 42 isolats appartenant à la section <i>Alternaria Porri</i>	61
Figure 17	Arbre phylogénétique reconstruit à partir de l’alignement de séquences RPB2 de 17 isolats appartenant au groupe B2 dans la phylogénie de la calmoduline.....	62
Figure 18	Aspect cultural des 13 isolats d’ <i>A.linariae</i>	65
Figure 19	Aspect cultural des 11 isolats d’ <i>A.grandis</i>	66
Figure 20	Aspect cultural des 15 isolats d’ <i>A.solani</i>	67
Figure 21	Aspect cultural des 03 isolats d’ <i>A.protenta</i>	68
Figure 22	Taille moyenne des conidies des 03 morphotypes d’ <i>Alternaria</i> spp.....	77
Figure 23	Schéma de mensuration des conidies d’ <i>Alternaria</i> spp (Orina <i>et al.</i> , 2011).....	70
Figure 24	Morphotype 1 représentant les conidies d’ <i>A.solani</i>	71
Figure 25	Morphotype 2 représentant les conidies d’ <i>A.linariae</i> (syn. <i>A.tomatophila</i>)	72
Figure 26	Morphotype 3 représentant les conidies d’ <i>A.grandis</i>	73
Figure 27	Effet des différents milieux de cultures sur la croissance mycélienne d’ <i>A.linariae</i> ...	80
Figure 28	Effet des différents milieux de cultures sur la croissance mycélienne d’ <i>A.grandis</i>	80

Figure 29	Effet des différents milieux de cultures sur la croissance mycélienne d' <i>A.solani</i>	81
Figure 30	Effet des différents milieux de cultures sur la croissance mycélienne d' <i>A.protenta</i> ...	81
Figure 31	Aspect sporulant sur le milieu de culture TWA.....	83
Figure 32	Aspect des conidies en bouquet sur les conidiophores.....	84
Figure 33	Effet de la température sur la croissance mycélienne d' <i>A.linariae</i>	87
Figure 34	Effet de la température sur la croissance mycélienne d' <i>A.grandis</i>	87
Figure 35	Effet de la température sur la croissance mycélienne d' <i>A.solani</i>	88
Figure 36	Effet de la température sur la croissance mycélienne d' <i>A.protenta</i>	88
Figure 37	Effet du pH sur la croissance mycélienne d' <i>A.linariae</i>	90
Figure 38	Effet du pH sur la croissance mycélienne d' <i>A.grandis</i>	90
Figure 39	Effet du pH sur la croissance mycélienne d' <i>A.solani</i>	91
Figure 40	Effet du pH sur la croissance mycélienne d' <i>A.protenta</i>	91
Figure 41	Distribution géographique des <i>Alternaria</i> spp en Algérie.....	94
Figure 42	Distribution des <i>Alternaria</i> spp en Algérie par espèce.....	94
Figure 43	Distribution des <i>Alternaria</i> spp par culture.....	94
Figure 44	Degré d'attaque des isolats d' <i>Alternaria</i> spp.	97
Figure 45	Evaluation de la gravité de la maladie	100
Figure 46	Symptômes typiques des <i>Alternaria</i> spp.....	101
Figure 47	Symptômes typiques des <i>Alternaria</i> spp.....	102
Figure 48	Profil du polymorphisme marqué par le locus Mic 23.....	106
Figure 49	Profil du polymorphisme marqué par le locus Mic 127.....	106
Figure 50	Décomposition spectrale (effectuée sur le capillaire 1) des fluorochromes.....	107
Figure 51	Taille des allèles microsatellites Mic 127 amplifiés	108
Figure 52	Calibration spectrale des ADN marqués de <i>A.solani</i>	109
Figure 53	Niveaux de résistance des 04 espèces étudiées	115
Figure 54	Niveau de résistance des trois principales espèces d' <i>Alternaria</i>	117
Figure 55	Croissance mycélienne de la souche légèrement résistante (DA094)	118
Figure 56	Croissance mycélienne de la souche légèrement résistante (DA094)	118
Figure 57	Croissance mycélienne de la souche sensible (DA008).....	118
Figure 58	Croissance mycélienne de la souche sensible (DA008).....	119
Figure 59	Croissance mycélienne de la souche moyennement résistante (DA014)	119
Figure 60	Croissance mycélienne de la moyennement résistante (DA101)	119
Figure 61	Effet des fongicides sur la germination des spores	120

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Superficies, production et rendements des 10 premiers pays producteurs de pomme de terre durant l'année 2017 (http://faostat.org).....	08
Tableau 2	Superficies, production et rendements des 10 premiers pays producteurs de tomate durant l'année 2017 (http://faostat.org).....	08
Tableau 3	Evolution des superficies, de la production et des rendements de la pomme de terre en Algérie durant la période 2007-2017.....	10
Tableau 4	Evolution des superficies, de la production et des rendements de la tomate en Algérie durant la période 2007-2017 (http://faostat.org).....	10
Tableau 5	Liste des 43 isolats des espèces d' <i>Alternaria</i> spp. à grandes conidies.....	37
Tableau 6	Liste des isolats utilisés pour le test microsattellites.....	40
Tableau 7	Les couples d'amorces des 03 locus microsattellites utilisés.....	41
Tableau 8	Isolats utilisés lors des inoculations artificielles croisées.....	44
Tableau 9	Echelle de notation de la maladie sur folioles détachées.....	47
Tableau 10	Echelle de notation de la maladie de 1 à 9 sur plants inoculés.....	47
Tableau 11	Résultats des isolements des <i>Alternaria</i> spp. à grandes conidies.....	55
Tableau 12	Résultats des pré identifications des isolats d'isolats d' <i>Alternaria</i> spp. à grandes conidies.....	55
Tableau 13	Caractères cultureux des 43 isolats d' <i>Alternaria</i> spp.....	64
Tableau 14	Caractères morphologiques des 04 espèces identifiées d' <i>Alternaria</i> spp.....	75
Tableau 15	Mensuration de taille des 28 isolats identifiées des 04 espèces d' <i>Alternaria</i> spp.....	76
Tableau 16	Classement des milieux de culture des <i>Alternaria</i> spp.	78
Tableau 17	Effet des différents milieux de cultures sur la sporulation des <i>Alternaria</i> spp... ..	84
Tableau 18	Classement des températures de croissance des <i>Alternaria</i> spp.	86
Tableau 19	Classement des pH de traitements de croissance des <i>Alternaria</i> spp.	89
Tableau 20	Répartition des <i>Alternaria</i> spp à grandes conidies	93
Tableau 21	Prévalence des quatre espèces <i>Alternaria</i> à grandes conidies	93
Tableau 221	Degrés d'attaque des isolats des 04 espèces d' <i>Alternaria</i>	96
Tableau 23	Analyse de la variance du degré d'attaque : variétés / isolats.....	98
Tableau 224	Classement des isolats selon le test LSD de Fisher au seuil de 5 %.....	98
Tableau 25	Classement des variétés selon le test LSA de Fisher au seuil de 5 %	99
Tableau 26	Résultats d'amplification avec les couples d'amorces des 03 locus microsattellites utilisés.....	105
Tableau 27	Les différents niveaux de résistance des isolats d' <i>Alternaria</i> spp	113
Tableau 28	Niveaux de résistance des <i>Alternaria</i> spp	121

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
AFLP	Amplified Fragment Length polymorphism
AGCT	Adénine, Guanine, Cytosine, Thymine
Alt a1	Alternaria alternata allergen
AUDPC	Area under disease progress curve
ARN	Acide ribonucléique
BET	Bromure d'éthidium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CI50	Concentration d'inhibition de 50%
CMV	Cucumber Mosaic Virus
dNTP	désoxynucléoside 5' triphosphate
EDTA	Ethylène Diamino Tétra Acétique
ENSA	Ecole Nationale Supérieure Agronomique
GATC	Biotech German company specialist in DNA and RNA sequencing
IBS	Inhibiteur de la Biosynthèse des Stérols
ITS	Internal Transcribed Spacer
MADRP	Ministère de l'agriculture et du développement rural et de la pêche.
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NUV	Near Ultraviolet
N-P-K	Azote-Phosphore –Potassium
QoI	Quinone outside inhibitors
PDA	Potato Dextrose Agar
PDT	Pomme De Terre
PCA	Potato Carotte Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVY	Potato Virus Y
PVX	Potato Virus X
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP	Restriction Fragments Length Polymorphism
RPB2	RNA Polymerase B2
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TMV	Tobacco Mosaic virus
TSWV	<i>Tomato Spotted Wilt Virus</i>
TWA	Target Water Agar
TYLCV	<i>Tomato Yellow Leaf Curl Virus</i>

LISTE DES UNITES DE MESURE

°C	degré Celsius
cm	centimètre
g/l	gramme par litre
h	heure
j	jour
JPI	Jour post incubation
mm	millimètre
mg/l	milligramme par litre
M	Molaire
mn	minute
mQ	milli-Q (eau ultra pure)
mM	milli-molaire
n	nano
nm	nanomètre
pb	paire de bases
pH	potentiel hydrogène
tpm	tour par minute
μ	micron
μl	microlitre
μM	micromolaire
s	seconde
W	watt

TABLES DES MATIERES

AVANT-PROPOS	I
REMERCIEMENTS	II
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	IV
DEDICACES	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES ABREVIATIONS	X
LISTE DES UNITES DE MESURE	XII
INTRODUCTION GENERALE	01
I. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	06
I.1. Importance économique de la pomme de terre et de la tomate dans le monde et en Algérie	06
I.1.1. Importance économique de la pomme de terre et de la tomate dans le monde.....	06
I.1.2. Importance économique de la pomme de terre et de la tomate en Algérie.....	07
I.1.3. Contraintes biotiques de la culture de la pomme de terre et de la tomate.....	09
I.2. Les <i>Alternaria</i> spp. inféodées à la pomme de terre et à la tomate	11
I.2.1. Historique du genre <i>Alternaria</i>	11
I.2.2. Taxonomie et relation phylogénétique des <i>Alternaria</i> spp.	12
I.2.3. Taxonomie des espèces d' <i>Alternaria</i> inféodées à la pomme de terre et à la tomate	13
I.2.4. Pathosystème pomme de terre-tomate/ <i>Alternaria</i> spp.....	16
I.2.4.1. Les espèces responsables de l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate et leur distribution géographique dans le monde et en Algérie	16
I.2.4.2. Symptomatologie de l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate.....	17
I.2.4.3. Cycle de l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate.....	18
I.2.4.4. Données épidémiologiques de l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate	20

I.2.5. Pouvoir pathogène et spécialisation parasitaire des <i>Alternaria</i> spp.	20
I.2.5.1. Pouvoir pathogène des espèces d' <i>Alternaria</i>	20
I.2.5.2. Spécialisation parasitaire des espèces d' <i>Alternaria</i> à grandes conidies inféodées à la tomate et à la pomme de terre	21
I.3. Variabilité et diversité génétique des <i>Alternaria</i> spp. inféodées à la pomme de terre et la tomate	22
I.3.1. Variabilité des isolats d' <i>Alternaria</i> spp. inféodés à la pomme de terre et la tomate....	22
I.3.2. Diversité génétique des isolats d' <i>Alternaria</i> spp. inféodés à la pomme de terre et la tomate.....	23
I.4. Le concept de races physiologiques chez l'espèce <i>A. solani</i>	23
I.5. Stratégie de lutte contre l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate	24
I.5.1. Les pratiques culturales	24
I.5.2. Utilisation de variétés résistantes ou tolérantes	25
I.5.3. L'utilisation d'antagonistes microbiens et d'extraits de plantes	26
I.5.4. L'utilisation de fongicides foliaires	26
I.5.4.1. Types de fongicides utilisés contre l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate	27
I.5.4.2. Gestion de la résistance aux fongicides chez les populations d' <i>Alternaria</i> spp.	28
 II. MATERIELS ET METHODES	
 II.1. Distribution des espèces <i>Alternaria</i> à grandes conidies sur pomme de terre et tomate selon les zones bioclimatiques algériennes	30
II.1.1. Prospection et échantillonnage.....	30
II.1.2. Isolement, purification monospore et conservation des isolats.....	31
 II.2. Caractérisation et identification des isolats d'<i>Alternaria</i> spp. à grandes conidies par des marqueurs moléculaires	32
II.2.1. Extraction et dosage d'ADN	32
II.2.2. PCR et Amplification des régions ITS.....	33
II.2.3. PCR spécifique.....	33

II.2.4. PCR/RFLP	34
II.2.5. Séquençage et analyse phylogénétique.....	34
II. 3. Caractérisation culturelle et morphologique des <i>Alternaria</i> spp. à grandes conidies..	35
II.3.1 Choix des groupes d'isolats étudiés.....	35
II.4. Influence des facteurs biologiques sur la croissance et la sporulation	
des <i>Alternaria</i> spp.....	35
II.4.1. Effet des milieux de culture sur la croissance mycélienne.....	36
II.4.2. Induction de la sporulation.....	36
II.4.3. Effet de la température et pH du milieu.....	38
II.4.4. Mensuration des spores.....	38
II.4.5. Analyse statistique.....	38
II.5 Analyse de la variabilité génétique au sein de l'espèce <i>A. solani</i>	
par des marqueurs de type microsatellites.....	39
II.5.1 Analyse du polymorphisme du locus caractérisé.....	39
II.5.2 Génotypage du marqueur microsatellite.....	39
II.5.2.1 Amplification par PCR et séquençage du locus Mic 127.....	41
II.5.2.2 Vérification de l'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose.....	42
II.5.2.3 Séquençage capillaire d'amplifias avec l'amorce fluo M13.....	42
II.6. Test pathologique et de spécialisation des espèces <i>Alternaria</i>	
à grandes conidies sur leurs hôtes pomme de terre et tomate.....	42
II.6. 1. Matériel végétal	43
II.6.2. Matériel fongique	44
II.6.3. Préparation de l'inoculum	44
II.6.4. Inoculation artificielle des folioles détachées de pomme de terre et de tomate.....	44
II.6.5. Inoculation artificielle des plants entiers de pomme de terre et de tomate	45
II.6.6. Notations de la maladie.....	45
II.6.7. Analyses statistiques.....	48

II.7. Etude <i>in vitro</i> des niveaux de résistance des <i>Alternaria</i> spp. de la pomme de terre et de la tomate aux deux fongicides : azoxystrobine et difenoconazole	48
II.7.1. Préparation des solutions de fongicides.....	48
II.7.2. Mesure de la croissance mycélienne des colonies.....	49
II.7.3. Mesure de l'élongation des tubes germinatifs.....	51
II.7.4. Mesure de la croissance des hyphes par néphélométrie	51
II.7.5. Analyse des données de croissance.....	53

III RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Pré-identification des <i>Alternaria</i> spp. à grandes conidies	54
III.2. Identification moléculaire des <i>Alternaria</i> spp. à grandes conidies	56
III.2.1. Identification des espèces d' <i>Alternaria</i> à grandes conidies par des amorces spécifiques.....	56
III.2.2. Différenciation d' <i>A.solani</i> et <i>A.grandis</i> par PCR RFLP	58
III.2.3. Identification des espèces <i>Alternaria</i> à grands conidies par séquençage.....	58
III.3. Caractérisation phénotypique des <i>Alternaria</i> spp.	62
III.3.1. Caractérisation culturale	63
III.3.2. Caractérisation morphologique.....	69
III.4. Exigences biologiques des <i>Alternaria</i> spp. sur la croissance et sporulation	77
III.4.1. Effet des milieux de culture sur la croissance mycélienne des <i>Alternaria</i> spp.....	77
III.4.2. Effet des milieux de culture sur la sporulation.....	79
III.4.3. Effet de la température du milieu sur la croissance des <i>Alternaria</i> spp.....	86
III.4.4. Effet du pH du milieu sur la croissance des <i>Alternaria</i> spp.....	89
III.5. Distribution géographique et prévalence des <i>Alternaria</i> spp. sur la culture de pomme de terre et tomate selon les étages bioclimatiques en Algérie	92
III.6. Pathogénicité et spécialisation parasitaire des espèces d'<i>Alternaria</i> spp. à grandes conidies sur pomme de terre et tomate	95
III.6.1. Pathogénicité et spécialisation parasitaire sur folioles détachées.....	95
III.6.1. Pathogénicité et spécialisation parasitaire sur plants de pomme de terre et tomate ...	99

III.7. Diversité génétique au sein de l'espèce <i>A. solani</i>	
par des marqueurs de type microsatellites.....	103
III.8. Niveaux de résistance des <i>Alternaria</i> spp. aux fongicides	
(azoxystrobine & difenoconazole).....	111
III.8.1. Etude sur les effets d'azoxystrobine et difénoconazole	
chez les <i>Alternaria</i> spp.....	112
III.8.1.1. Effets sur la croissance mycélienne des <i>Alternaria</i> spp.....	112
III.8.1.2 Effets sur la germination des spores et l'élongation des tubes germinatifs	
des <i>Alternaria</i> spp.....	115

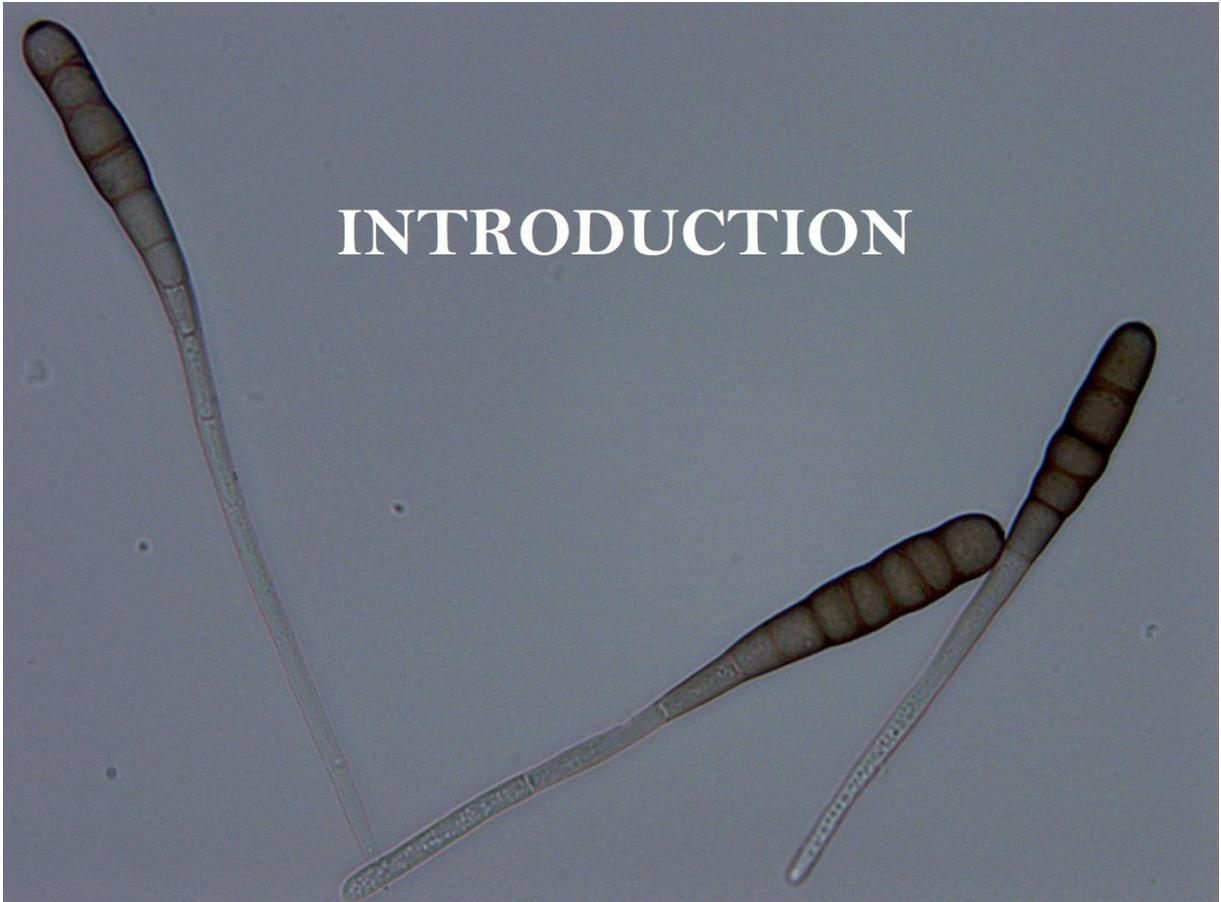
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

RESUME

INTRODUCTION



INTRODUCTION GENERALE

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) et la tomate (*S. lycopersicum* L.) représentent les deux cultures de solanacées les plus importantes sur le plan économique et les deux principaux légumes les plus populaires en Algérie. Ces deux cultures sont réparties à travers les diverses zones bioclimatiques de l'Algérie (humide, subhumide, semi-aride, aride et saharien) et sont conduites selon différentes pratiques culturales. Les rendements de ces deux cultures sont cependant restés relativement faibles comparativement à ceux obtenus dans les pays développés.

Les cultures de la pomme de terre et de la tomate qui se répartissent en Algérie du Nord au Sud et d'Est en Ouest sont localisées dans des régions bioclimatiques très contrastées d'un point de vue de la pluviométrie et de la température. La pomme de terre qui est considérée comme une culture de plein champ occupe des superficies importantes dans plusieurs régions du nord (Ain Defla), du sud (El Oued), de l'est (Skikda, Guelma) et de l'ouest (Mostaganem, Mascara) et connaît trois types de cultures successives par an (primeur, saison et arrière-saison). Au contraire, la tomate est cultivée principalement dans le nord de l'Algérie sur de plus petites surfaces et le plus souvent sous abri plastique comme dans la région de Biskra. Au cours de la dernière décennie (2007-2017), la production et les superficies algériennes de pomme de terre consommé essentiellement en frais sont passés respectivement de 1 506 859 à 4 606 403 t et de 79 339 à 148 692 ha (FAOSTAT, 2017). Durant cette même période, la production et les superficies des cultures de tomate fraîche sont respectivement passées de 567 313 à 1 286 286 t et de 20 079 à 23 977 ha (FAOSTAT, 2017).

En Algérie, l'intensification de ces deux cultures sans respect des rotations et des pratiques agro-techniques convenables a été remarquable durant ces deux dernières décennies, puisque les superficies ont fortement augmentées notamment dans certaines régions littorales du Nord où les cultures de pomme de terre et de tomate se côtoient ou se succèdent sur les mêmes parcelles ainsi que dans les zones sahariennes comme El Oued où les cultures de pomme de terre occupent des superficies relativement importantes. Cette situation a engendré un développement important des maladies dues à des champignons (mildiou, alternariose, rhizoctone brun, pourriture grise, etc.), à des bactéries (flétrissement bactérien, pourriture bactérienne, gale bactérienne, etc.), à des virus (PVY, PVY, TMV, CMV, TSWV, TYLCV, etc.) et à des nématodes (nématodes à galle, nématodes à kystes, nématodes à lésions racinaires, etc.). Parmi ces maladies, l'alternariose ou brûlure alternarienne causée par un complexe d'espèces appartenant au genre *Alternaria*

représente l'une des maladies foliaires les plus destructrices de la pomme de terre et de la tomate. Cette maladie que les anglo-saxons dénomment également “early blight” (pour la différencier du “late blight” ou mildiou de la pomme de terre), “leaf spot”, “brown spot”, etc. se manifeste par l'apparition sur les folioles de taches nécrotiques qui sont entourées le plus souvent d'un halo jaunâtre et qui sont plus ou moins circulaires avec la formation de cercles concentriques (d'où le nom de “target spot” également attribué par les anglo-saxons à cette maladie). Des taches de forme allongée et des pourritures noires bien sporulantes peuvent se former sur les tiges et sur les fruits de la tomate (Kumar et *al.*, 2008).

L'agent causal de l'alternariose a été décrit pour la première fois en 1882 sous le nom de *Macrosporium solani* par Ellis & Martin, puis dénommé *Alternaria solani* en 1896 par Sorauer. Pendant longtemps, l'agent causal de l'alternariose a été attribué à deux principaux agents pathogènes présentant deux différents types de conidies : *A. solani* Sorauer à grandes conidies, solitaires et pourvues d'un long bec et *A. alternata* (Fr.) Keissl. (syn. *A. tenuis* Nees) à petites conidies, caténulées et ayant un bec très court. Cette dernière espèce qui a été trouvée sur des feuilles en décomposition, a été initialement considérée comme saprophyte (Jones & Grout, 1897). Plus récemment, Simons (2000) a décrit sur les solanacées et en particulier sur la pomme de terre et la tomate, plusieurs espèces d'*Alternaria* à grandes conidies : *A. grandis* E.G. Simmons morphologiquement très proche d'*A. solani*, *A. tomatophila* E.G. Simmons inféodée à la tomate, *A. cretica* E.G. Simmons & Vakal spécifique à la tomate cerise et *A. subcylindrica* E.G. Simmons & R.G. Roberts. Ces trois dernières espèces sont morphologiquement proches d'*A. solani* et d'*A. grandis*. D'autres espèces à petites conidies comme *A. arborescens* E.G. Simmons, *A. infectoria* E.G. Simmons et *A. tenuissima* (Kunze) Wiltshire ont été également signalées sur tomate et sur pomme de terre en plus d'*A. alternata*. Aujourd'hui, plusieurs auteurs considèrent que les espèces d'*Alternaria* causent sur pomme de terre et tomate deux types de maladie avec deux dénominations différentes : “early blight” pour les espèces à grandes conidies et “brown spot” pour celles à petites conidies (Nolte, 2008 ; van der Waals et *al.*, 2011 ; Dube, 2014).

La tâche n'est pas toujours aisée lorsqu'il s'agit de donner un nom à l'une des espèces isolées à partir d'un symptôme et ceci pour les espèces à grandes conidies ou à petites conidies à cause de la variabilité intra-spécifique et du chevauchement des caractères morphologiques qui existent entre les espèces des deux groupes. Les nouveaux outils moléculaires (amorces spécifiques, analyse des ITS et de certains gènes) appliqués au genre *Alternaria* depuis une dizaine d'années ont rendu plus précis l'identification des espèces d'*Alternaria* inféodées à la pomme de terre et à la tomate (Cardoso, 2014). C'est ainsi que durant cette dernière décennie, les données des

séquences des nucléotides des régions de certains gènes (18S nrDNA, 28S nrDNA, ITS, GAPDH, RPB2 et TEF1-alpha) ont permis de délimiter les lignées phylogénétiques des espèces d'*Alternaria* inféodées à la pomme de terre et à la tomate en deux sections : *Alternata* et *porri* dont les espèces sont respectivement très polyphages ou plus spécifiques (Woundenberg et al., 2014 ; Lawrence et al., 2016).

Le séquençage de certains gènes a permis l'identification de certaines espèces à grandes conidies sur ces deux cultures et a rendu caduque une certaine spécialisation longtemps préétablie chez les espèces d'*Alternaria* inféodées à la tomate et à la pomme de terre. A titre d'exemple, l'espèce *A. grandis* qui a été longtemps confondue avec *A. solani*, est de plus en plus signalée non seulement sur pomme de terre à travers le monde mais également sur tomate. Woundenberg et al. (2013) ont d'ailleurs retenu *A. grandis* comme une espèce distincte d'*A. solani* et ont également regroupé les espèces responsables de l'alternariose de la tomate (*A. tomatophila*, *A. cretica* et *A. subcylindrica*) sous une seule et même espèce *A. linariae* (Neerg.) E.G. Simmons. L'espèce *A. grandis* est de plus en plus décrite sur pomme de terre en Amérique latine (Lourenço et al., 2009), en Europe (Landeersland et al., 2016) et en Afrique du Nord (Bessadat et al., 2016).

A la suite des travaux de Gannibal et al., (2012) qui ont réussi à obtenir sur folioles détachées une pathogénicité d'*A. grandis* et *A. linariae* sur pomme de terre et tomate, la spécialisation parasitaire des espèces d'*Alternaria* inféodées à ces deux plantes semble être remise en cause. Ceci est confirmé par Cardoso (2014) qui a isolé au cours de prospections à travers différentes régions du Brésil *A. grandis* et *A. linariae* à partir de pomme de terre, par Bessadat et al., (2017) qui ont isolé *A. grandis* à partir de tomate et par Ayad et al. (2017) qui ont identifié *A. protenta* sur pomme de terre alors que cette dernière espèce est fréquemment signalée sur tournesol. C'est dans le contexte de la remise en cause de la gamme d'hôte de certaines espèces d'*Alternaria* inféodées à la pomme de terre et à la tomate et appartenant à la section *Porri* que notre présent travail a été mené entre 2012 et 2015.

OBJECTIFS DE LA THESE

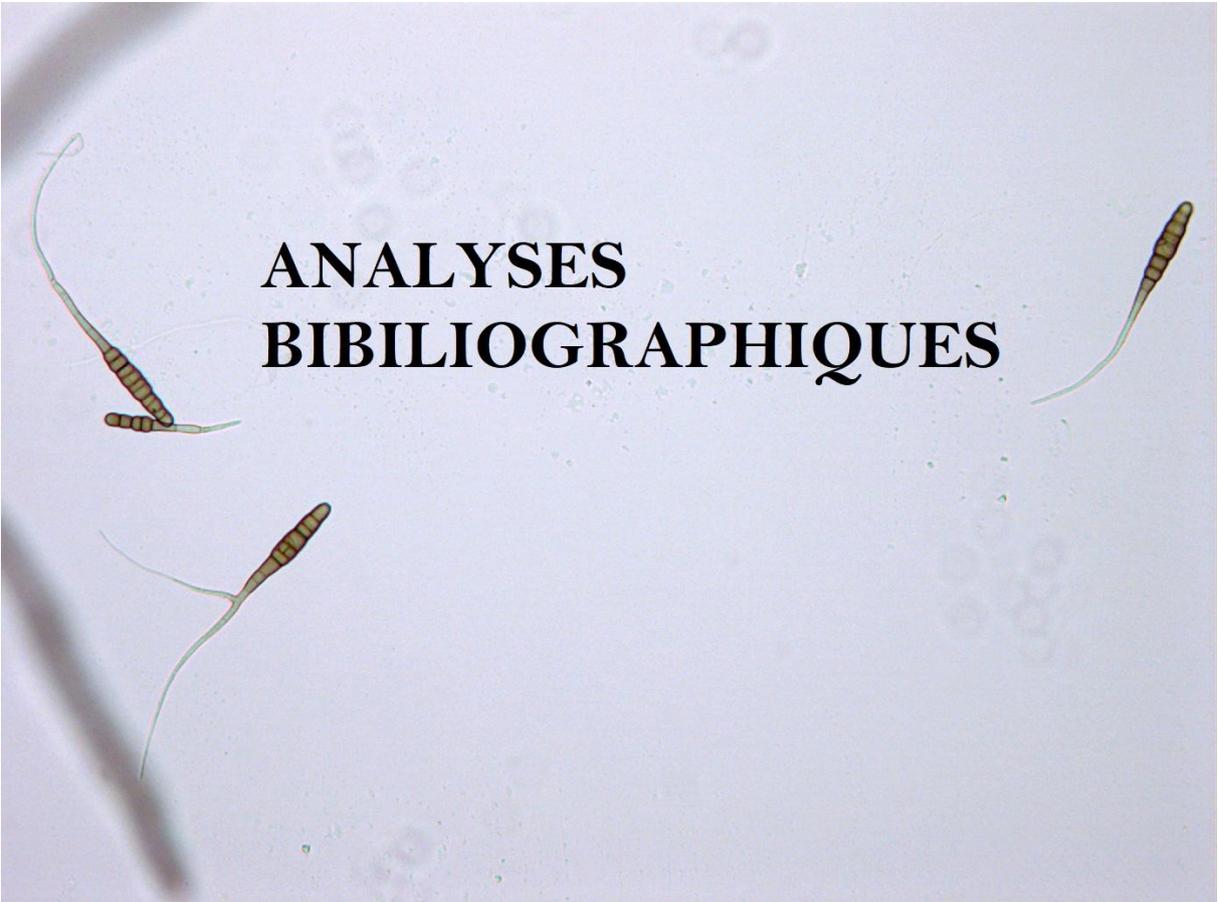
Afin de mieux comprendre le pathosystème des espèces d'*Alternaria* inféodées aux cultures de pomme de terre et tomate en Algérie, les travaux présentés dans cette thèse ont porté sur les aspects suivants.

1. Afin de situer la problématique et le contexte scientifique et socio-économique de nos recherches, nous avons réalisé une synthèse bibliographique qui nous a permis de faire le point sur les connaissances actuelles concernant le pathosystème pomme de terre et

tomate/*Alternaria* spp., sur la diversité génétique, sur les moyens de lutte utilisés à l'égard de ce groupe d'espèces pathogènes et sur leur résistance à deux fongicides actuellement utilisés par les agriculteurs (Chapitre I).

2. Comme premier objectif de recherche, notre présent travail devait apporter des réponses sur la répartition des principales espèces à grandes conidies inféodées à la pomme de terre et à la tomate. Cette répartition compléterait celle déjà réalisée par Bessadat et *al.*, (2014) axé surtout sur les espèces à petites conidies et où les prospections ont été effectuées uniquement dans le Nord-Ouest de l'Algérie. A cet effet, des prospections ont été réalisées durant la période 2012-2015 pour une meilleure connaissance des espèces pathogènes d'*Alternaria* à grandes conidies et de leur distribution à travers les principales régions productrices de pomme de terre et tomate selon les différents étages bioclimatiques (Chapitre II-1).
3. Etant donné que les symptômes de l'alternariose et les caractéristiques morphologiques des isolats ne permettent pas d'établir une distinction nette entre les différentes espèces d'*Alternaria* à grandes conidies, l'identification spécifique des isolats a été basée sur la PCR avec des amorces spécifiques, sur la PCR/RFLP par double digestion enzymatique d'une portion du gène calmoduline et sur l'analyse des séquences des gènes calmoduline et RPB2 (Chapitre II-2).
4. Face à la caractérisation moléculaire, les caractères cultureux et morphologiques bien qu'ils démontrent clairement une bonne variabilité culturelle et morphologique inter et intra-spécifique, restent insuffisants pour identifier et bien séparer les différentes espèces d'*Alternaria*. Cependant nous avons réalisé une étude phénotypique des espèces isolées (Chapitre II-3) dans le but de montrer la variabilité morpho-culturelle que connaît les populations d'*Alternaria* spp. et qui est traditionnellement utilisée dans l'identification des *Alternaria* spp., mais qui est devenue ces dernières années insuffisantes face à la biotechnologie et la biologie moléculaire permettant d'une manière très précises l'identification de chaque espèce. Le protocole d'induction et mensuration des spores a bien été réalisé complété par l'étude des facteurs biologique jouant un rôle dans la caractérisation morpho-culturelle des *Alternaria* spp. a été détaillé dans le chapitre II-4.
5. La diversité génétique des populations d'*A. solani* a aussi pris une part dans notre étude en analysant avec des marqueurs moléculaires microsatellites l'existence d'un polymorphisme (Chapitre II-5).

6. Dans l'étude pathologique, nous nous sommes intéressés à évaluer non seulement l'agressivité de quelques isolats représentatifs des différentes espèces identifiées sur leurs hôtes respectifs à savoir la pomme de terre et la tomate, mais également de clarifier la spécialisation parasitaire des espèces d'*Alternaria* à grandes conidies, notamment *A. linariae* et *A. protenta* qui ont été nouvellement identifiées sur ces deux plantes. Ceci a été vérifié *in vitro* par des inoculations artificielles croisées dans des conditions proches de celles de la nature (Chapitre II-6).
7. Un dernier aspect de nos recherches a porté sur l'évaluation de quelques matières actives par la technique innovante de néphélobimétrie en vue de vérifier le niveau de résistance des espèces identifiées d'*Alternaria* spp. à l'égard des fongicides actuellement utilisés en Algérie. Les résultats de cette technique ont été comparés avec ceux obtenus par la technique conventionnelle d'incorporation du fongicide dans un milieu de culture (Chapitre II-7).

A microscopic image showing several nematodes (small worms) on a light blue background. The nematodes are elongated, segmented, and have a distinct head and tail. They are positioned around the central text. The text is in a bold, black, serif font.

**ANALYSES
BIBLIOGRAPHIQUES**

I. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

La famille des Solanacées comporte environ 90 genres et plus de 3000 espèces originaires principalement du sud et du centre de l'Amérique. *Solanum* L. représente le plus grand genre de cette famille englobant 1250 à 1700 espèces dont certaines sont économiquement importantes comme, notamment, la pomme de terre (*S. tuberosum* L.) et la tomate [*S. lycopersicum* L. (syn. *Lycopersicon esculentum* Mill.)]. La pomme de terre et la tomate sont deux plantes herbacées, vivaces et cultivées comme plante annuelle (Rossignol, & Rouselle-Bourgeois, 1996). La pomme de terre est originaire des hauts plateaux des Andes péruviennes et boliviennes où les incas connurent ce tubercule depuis plus de 10 000 ans (Stevenson et al., 2001). La tomate et les espèces qui lui sont apparentées ont pour centre d'origine la région étroite et montagneuse des Andes englobant le Pérou, l'Equateur et le Chili (Jones et al., 2014). Parmi les neuf espèces sauvages apparentées à la tomate, deux seulement en plus du *S. lycopersicum* L. sont comestibles : *S. pimpinellifolium* L. communément appelé tomate groseille et *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Alef.) Fosberg ou tomate cerise qui représente l'ancêtre des tomates actuellement connues (De Broglie et Guérault, 2005 ; Renaud, 2006).

I.1. Importance économique de la pomme de terre et de la tomate dans le monde et en Algérie

I.1.1. Importance économique de la pomme de terre et de la tomate dans le monde

La pomme de terre constitue la culture vivrière non céréalière la plus importante à l'échelle mondiale où elle occupe le quatrième rang après le blé, le riz et le maïs (Bowen, 2003). Étant donné sa grande importance diététique et économique, la pomme de terre est cultivée à travers les cinq continents du globe où sa culture est pratiquée dans plus de 150 pays (Birch et al., 2012 ; Chemak et al., 2014). La production mondiale de pomme de terre n'a pas cessé d'évoluer au cours du temps, passant de 316,44 millions de tonnes en 2002 à 385,07 millions de tonnes en 2017 (FAOSTAT, 2017). En 2017, la Chine représente le premier pays producteur de pomme de terre dans le monde avec une production de 99 205 580 tonnes, suivie de l'Inde (48 605 000 tonnes) et de la Fédération de Russie (29 589 976 tonnes) (FAOSTAT, 2017). Les superficies réservées à cette culture ainsi que les productions et les rendements des dix premiers pays producteurs de pomme de terre durant l'année 2017 sont indiqués dans le tableau 1.

Après la pomme de terre et la patate douce, la tomate représente la troisième espèce cultivée, et le deuxième légume le plus consommé dans le monde que ce soit en frais ou après transformation

(Blancard et *al.*, 2012). Elle est considérée comme un aliment de protection car le pigment lycopène contenu dans ses fruits a des propriétés anti-oxydantes, d'où l'intérêt de plus en plus grandissant pour cette culture (Gerszberg et *al.*, 2015). La production mondiale de la tomate a atteint 182 301 395 tonnes en 2017 (FAOSTAT, 2017). La Chine reste le premier pays producteur de tomate avec une production de 59 626 900 tonnes, suivi par l'Inde (20 708 000 tonnes), la Turquie (12 750 000 tonnes) et les États-Unis d'Amérique (10 910 990 tonnes). Les superficies réservées à cette culture ainsi que les productions et les rendements des dix premiers pays producteurs de tomate durant l'année 2017 sont indiqués dans le tableau 2.

I.1.2. Importance économique de la pomme de terre et de la tomate en Algérie

De par les superficies qui lui sont actuellement consacrées, la pomme de terre occupe en Algérie la deuxième place après les céréales. Par contre, elle se place au premier rang des cultures maraichères du point de vue de la superficie et de la production. Celle-ci est passée de 1 506 859 en 2007 à 4 606 403 tonnes en 2017 (FAOSTAT, 2017). La superficie réservée à cette culture a augmenté de 79 339 ha en 2007 à 148 692 ha en 2017 alors que le rendement est passé de 189,927 qx/ha en 2007 à 309,795 qx/ha en 2017 (FAOSTAT, 2017). L'évolution des superficies, de la production et des rendements de la pomme de terre en Algérie durant la période 2007-2017 sont indiqués dans le tableau 3. La culture de la pomme de terre qui est présente à travers toutes les zones climatiques algériennes est cultivée toute l'année selon trois types de culture :

– **La culture de primeur** : Celle-ci est pratiquée surtout sur le littoral et dans certaines régions du sud (El Oued, Adrar). En 2014, ce type de culture a occupé une superficie de 5 050 ha et a donné une production de 116 652 tonnes (MADRP, 2014).

– **La culture de saison** : Ce type de culture se pratique dans toutes les wilayates productrices de pomme de terre : Mascara, Tlemcen, Tiaret, Mostaganem, Chlef, Aïn Defla, Tipaza, Alger, Boumerdes, Bouira, Tizi-ouzou, Skikda, Guelma, Sétif, Mila, Batna et El Oued. En 2014, ce type de culture a occupé une superficie de 83 905 ha et a donné une production de 2 689 029 tonnes (MADRP, 2014). Les rendements les plus élevés sont obtenus durant les cultures de saison

– **La culture d'arrière-saison** : Ce type de culture se pratique dans des zones à forte potentialité d'irrigation. En 2014, ce type de culture a occupé une superficie de 98 731 ha et a donné une production de 1 864 692 tonnes (MADRP, 2014).

Tableau 1 Superficies, production et rendements des 10 premiers pays producteurs de pomme de terre durant l'année 2017 (<http://faostat.org>).

Pays	Superficies (ha)	Production (t)	Rendements (q/ha)
1. Chine	5 767 481	99 205 580	172,00
2. Inde	2 179 000	48 605 000	223,06
3. Fédération de Russie	1 889 208	29 589 876	156,62
4. Ukraine	1 323 200	22 208 220	167,83
5. Etats Unis d'Amérique	415 010	20 017 350	482,33
6. Allemagne	250 500	11 720 000	467,86
7. Bangladesh	499 725	10 215 957	204,43
8. Pologne	329 323	9 171 733	278,50
9. Pays-Bas	160 791	7 391 881	459,72
10. France	173 486	7 342 203	423,21

Tableau 2 Superficies, production et rendements des 10 premiers pays producteurs de tomate durant l'année 2017 (<http://faostat.org>).

Pays	Superficies (ha)	Production (t)	Rendements (q/ha)
1. Chine	1 033 276	59 626 900	577,06
2. Inde	797 000	20 708 000	259,82
3. Turquie	187 070	12 750 000	681,56
4. Etats Unis d'Amérique	126 070	10 910 990	865,33
5. Egypte	182 444	7 297 168	399,96
6. Iran	153 735	6 177 290	401,81
7. Italie	99 750	6 015 868	603,09
8. Espagne	60 852	5 163 466	848,52
9. Mexique	92 993	4 243 058	456,27
10. Brésil	61 534	4 230 150	687,44

La tomate occupe en Algérie une place prépondérante dans le secteur maraîcher. Elle est considérée comme une espèce prioritaire comme la pomme de terre et l'oignon. La tomate qui est

une plante des pays chauds, peut être cultivée dans toutes les régions d'Algérie : en culture de primeur (sous serre dans les zones du sud et du littoral), en culture de saison (dans toutes les régions d'Algérie) et en culture d'arrière-saison (zones littorales du centre et de l'ouest algérien). En 2017, la superficie réservée à cette culture s'est élevée à 23 917 ha donnant une production de 1 286 286 tonnes et un rendement de 536,467 qx/ha (<http://faostat.org>). Les rendements de cette culture demeurent cependant relativement faibles par rapport à ceux enregistrés dans certains pays du bassin méditerranéen (Maroc, Espagne, France, Italie) où ils varient entre 603,095 qx/ha (Italie) à 1 873,352 qx/ha (France) (FAOSTAT, 2017). La tomate industrielle occupe également une place importante en Algérie où les superficies cultivées se sont élevées à plus de 20 000 hectares en 2014 (MADRP, 2016). L'évolution des superficies, de la production et des rendements de la tomate en Algérie durant la période 2007-2017 sont indiqués dans le tableau 4.

I.1.3. Contraintes biotiques de la culture de la pomme de terre et de la tomate

Les cultures de pomme de terre et de tomate subissent chaque année des pertes non négligeables causées par les maladies (fongiques, bactériennes, virales, etc.) et par certains ravageurs. Ces derniers peuvent provoquer des dégâts importants sur les cultures de tomate sous serre ou en plein champ comme, par exemple, *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Guenaoui, 2008 ; Badaoui & Berkani, 2010). Parmi les maladies, le mildiou et l'alternariose causés respectivement par l'oomycète *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary et par certaines espèces fongiques d'*Alternaria* entraînent, le plus souvent, des pertes considérables. Les dommages causés par les espèces d'*Alternaria* sont influencés par l'âge de la culture. En effet, les jeunes plantes sont relativement résistantes alors que les plants matures sont plus sensibles (Rotem, 1981 ; Pelletier et Fry, 1989 ; Johnson et Teng, 1990 ; Shtienberg et al., 1996 ; Campo et al., 2001). Les espèces d'*Alternaria* affectent principalement le feuillage et entraînent une nécrose des feuilles et une défoliation prématurée des plantes (Leiminger et Hausladen, 2012).

Des pertes non négligeables sur le rendement sont souvent causées par les espèces d'*Alternaria* sur les cultures de pomme de terre et de tomate. Les premières publications sur l'alternariose citent des pertes de rendement allant de 5 à 50 % (Van der Waals et al., 2001 ; Tsedaley, 2014). Le plus souvent, les pertes peuvent atteindre 78% sur la tomate (Rotem 1994) et 60% sur la pomme de terre (Kolte, 2002). La lutte contre l'alternariose semble cependant limiter les pertes sur les rendements de la tomate et de la pomme de terre (Van der Waals et al., 2001). En Algérie, l'alter-

Tableau 3 Evolution des superficies, de la production et des rendements de la pomme de terre en Algérie durant la période 2007-2017 (<http://faostat.org>).

Annees	Superficies (ha)	Production (t)	Rendements (q/ha)
2007	79 339	1 506 859	189,92
2008	91 841	2 171 058	236,39
2009	105 121	2 636 057	250,76
2010	121 996	3 300 312	270,52
2011	131 903	3 862 194	292,80
2012	138 666	4 219 476	304,29
2013	140 000	4 400 000	314,28
2014	156 176	4 673 516	299,24
2015	153 313	4 539 577	296,09
2016	156 296	4 758 137	304,43
2017	148 692	4 606 403	309,79

Tableau 4 Evolution des superficies, de la production et des rendements de la tomate en Algérie durant la période 2007-2017 (<http://faostat.org>).

Annees	Superficies (ha)	Production (t)	Rendements (q/ha)
2007	20 079	567 313	282,54
2008	19 655	559 249	284,53
2009	20 789	641 034	608,35
2010	21 358	718 235	336,28
2011	20 575	771 606	375,02
2012	21 542	796 963	369,95
2013	22 497	975 075	433,42
2014	22 646	1 065 609	470,55
2015	24 065	1 163 766	483,59
2016	22 556	1 280 570	567,72
2017	23 977	1 286 286	536,46

nariose est devenue un problème sensible pour la production de ces deux cultures : une augmentation de sa gravité a été observée dans la plupart des régions de l'ouest de l'Algérie (Bessadat, 2014).

I.2. Les *Alternaria* spp. inféodées à la pomme de terre et à la tomate

Les espèces appartenant au genre *Alternaria* sont extrêmement répandues dans divers habitats (Joly, 1964 ; Ellis 1971, 1976 ; Simmons, 1992). Simmons (2007) reconnaît dans ce genre 276 espèces. Un certain nombre de ces espèces qui possèdent de grandes conidies provoquent des maladies économiquement importantes sur la pomme de terre et la tomate comme *A. solani* et *A. grandis* sur *S. tuberosum* et *A. linariae*, *A. subtropica* et *A. elegans* sur *S. lycopersicum* (Simmons, 2000 ; Woudenberg et al. 2014). A ces dernières, il faut ajouter d'autres espèces à petites conidies comme *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. infectoria* et *A. tenuissima* qui ont été également signalées sur tomate et sur pomme de terre (Orina et al., 2012 ; Bessadat et al., 2014 ; Tymon et al., 2016 ; Kokaeva et al., 2018).

I.2.1. Historique du genre *Alternaria*

Le genre *Alternaria* Nees est un hyphomycète dont les espèces produisent des phaeodictyospores (dématiacée). Ce genre a été initialement mal décrit. En effet, il a été originellement établi par Nees avec comme espèce type *A. tenuis* Nees (Nees von Esenbeck, 1816-1817). Fries (1832) ne reconnaît pas ce genre dans son "*Systema mycologicum*" et cite l'espèce *A. tenuis* comme synonyme de *Torula alternata* Fr. De plus, il a érigé un nouveau genre *Macrosporium* Fr. compliquant ainsi la taxonomie du genre *Alternaria*. Par la suite, deux autres genres *Stemphylium* Wallr. (Wallroth, 1833) et *Ulocladium* Preuss (Preuss, 1851) qui sont des hyphomycètes phaeodictyosporés ont été décrits ce qui a compliqué encore plus la résolution taxonomique des *Alternaria*. En raison des ambiguïtés dans la description d'*A. tenuis* établie par Nees, Von Keissler (1912) a synonymisé les deux espèces *A. tenuis* et *T. alternata* avec *A. alternata* (Fr.) Keissl. qui est maintenant reconnue comme l'espèce type de ce genre.

Par la suite, Elliot (1917) dans son étude comparative des genres *Alternaria* et *Macrosporium* a proposé six groupes morphologiques d'*Alternaria* avec une espèce représentative caractérisant chaque groupe. Wiltshire (1933) a considéré que le genre *Macrosporium* devrait être placé sur la liste des *nomina ambigua* et a proposé sa suppression en faveur du genre *Alternaria*. Plus tard, des systèmes de classification ont été proposés par Neergaard (1945) qui, en se basant sur la longueur des chaînes de conidies, a regroupé les espèces en 3 sections (*longicatenatae*, *brevicatenatae* et

noncatenatae) et par Joly (1964) qui les a également classées en trois sections (*claroseminae*, *brunneoseminae*, *rigidae*) sur la base de la couleur, de la rigidité ou de la symétrie latérale des conidies. Ces classifications qui n'étaient pas en conformité avec les règles du Code international de nomenclature botanique de l'époque n'ont pas été adoptées (Lawrence et al., 2016). La classification morphologique du genre *Alternaria* a atteint finalement son apogée avec les travaux de Simmons (1967, 1971, 1989, 1992, 2007) qui a défini les caractères distinctifs de chaque espèce.

I.2.2. Taxonomie et relation phylogénétique des *Alternaria* spp.

Le genre *Alternaria* appartient à la famille *Pleosporaceae*, à l'ordre *Pleosporales*, à la classe *Dothideomycetes*, au sous phylum *Pezizomycotina*, au phylum *Ascomycota* et au règne *Fungi* (www.indexfungorum.org ; www.mycobank.org). Aucun stade sexué n'a été signalé pour la plupart des espèces qui se caractérisent par la production de conidies sombres, pluricellulaires, pourvues de cloisons transversales et longitudinales (phaeodictyospores), pouvant être caténulées ou solitaires, à apex pointu ou se terminant par un bec (Elliott, 1917 ; Wiltshire, 1933 ; Neergaard, 1945 ; Joly, 1964 ; Simmons, 1967).

A l'intérieur du genre *Alternaria*, les espèces ont été principalement définies selon les caractéristiques morphologiques des conidies (taille et septation, présence ou absence d'un bec, taille de celui-ci) et le mode de caténulation. Etant donné la diversité de ces espèces d'*Alternaria*, plusieurs sous-groupes génériques ayant les mêmes caractéristiques morphologiques des conidies ont été proposés (Elliot, 1917 ; Neergaard, 1945 ; Joly, 1964 ; Ellis, 1971, 1976). Simmons (1992) a organisé le genre en un certain nombre de groupes morphologiques dont chacun est typifié par une espèce. C'est ainsi que, par exemple, le groupe d'espèce *alternata* comporte des espèces ayant de petites spores (<60 µm) caténulées comme celles d'*A. alternata* et que le groupe *porri* comprend des espèces à grandes conidies (60 à 100 µm) non caténulées et pourvues d'un long bec comme ceux d'*A. porri* (Ellis) Cif. Par la suite, Simmons et Roberts (1993) ont subdivisé les taxa à petites spores caténulées en six groupes morphologiques en se basant sur le mode de sporulation.

L'analyse phylogénétique des séquences des ITS et de la petite sous unité mitochondriale de l'ADN ribosomal (mt SSU rDNA) des espèces d'*Alternaria* et des genres apparentés *Stemphylium* et *Ulocladium* a révélé que *Stemphylium* est phylogénétiquement distinct d'*Alternaria* et d'*Ulocladium* qui forment une seule clade monophylétique composée de plusieurs groupes d'espèces : *alternata*, *porri*, *brassicicola*, *infectoria* et *radicina* (Pryor et Gilbertson, 2000). Les études ultérieures basées sur des données morphologiques et moléculaires ont permis d'identifier

d'autres groupes d'espèces comme : *sonchi* (Hong et al., 2005), *alternantherae* (Lawrence et al. 2012), *panax* et *gypsophilae* (Lawrence et al., 2013) élevant ainsi le nombre de groupes d'espèces à 9.

Des analyses phylogénétiques basées sur cinq gènes codant pour des protéines (gpd, Alt a 1, actine, membrane plasmique ATPase et calmoduline) ont révélé huit lignées bien distinctes d'*Alternaria* qui ont été élevées au rang taxonomique de sections : *Alternaria*, *Alternantherae*, *Brassicicola*, *Gypsophilae*, *Panax*, *Porri*, *Radicina* et *Sonchi* (Lawrence et al., 2013).

En se basant sur les séquences nucléotidiques des régions de certains gènes (18S nrDNA, 28S nrDNA, ITS, GAPDH, RPB2 et TEF1-alpha), Woudenberg et al. (2013) ont assigné les espèces d'*Alternaria* dans 24 sections dont 16 sont nouvellement décrites (Fig.1). Des études phylogénétiques récentes ont permis l'identification d'autres sections d'*Alternaria* comme *Pseudoalternaria* (Lawrence et al., 2014, 2016) et *Soda* (Grum-Grzhimaylo et al., 2015). Sur la base des travaux de phylogénie moléculaire de Lawrence et al. (2013, 2014), de Woudenberg et al. (2013) et de Grum-Grzhimaylo et al. (2015), Lawrence et al. (2016) ont présenté un cladogramme consensuel des sections d'*Alternaria* basé sur sept loci nucléaires (Fig.2).

I.2.3. Taxonomie des espèces d'*Alternaria* inféodées à la pomme de terre et à la tomate

Les sections *Alternaria*, *Infectoria* et *Porri* comportent certaines espèces rencontrées communément sur les Solanacées cultivées. Les sections *Alternaria* et *Infectoria* renferment des espèces ayant de petites conidies caténulées dont certaines comme *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. tenuissima* et *A. infectoria* ont été impliquées dans le complexe des pathogènes causant l'alternariose « early blight » et « brown spot » sur pomme de terre et tomate (Orina et al., 2010 ; Elansky et al., 2012 ; Bessadat et al., 2014, 2017 ; Kokaeva et al., 2018). La section *Porri* contient la plupart des espèces ayant de grandes conidies pourvues d'un long bec. Certaines de ces espèces sont des pathogènes importants de la pomme de terre et de la tomate comme *A. solani* et *A. tomatophila* qui sont responsables de l'alternariose « early blight » de ces deux cultures.

La taxonomie d'*A. solani* et d'*A. tomatophila* a subi une révision au cours de cette dernière décennie. Simmons (2000) a reconnu sur la base des critères morphologiques et culturels des isolats d'*A. solani* provenant de plantes hôtes appartenant à la famille des Solanacées, de nouvelles espèces comme *A. subtropica* E.G. Simmons, *A. tomatophila* E.G. Simmons et *A. cretica* E.G. Simmons & Vakal. (sur *S. lycopersicum* L.), *A. subcylindrica* E.G. Simmons & R.G. Roberts [sur *S.*

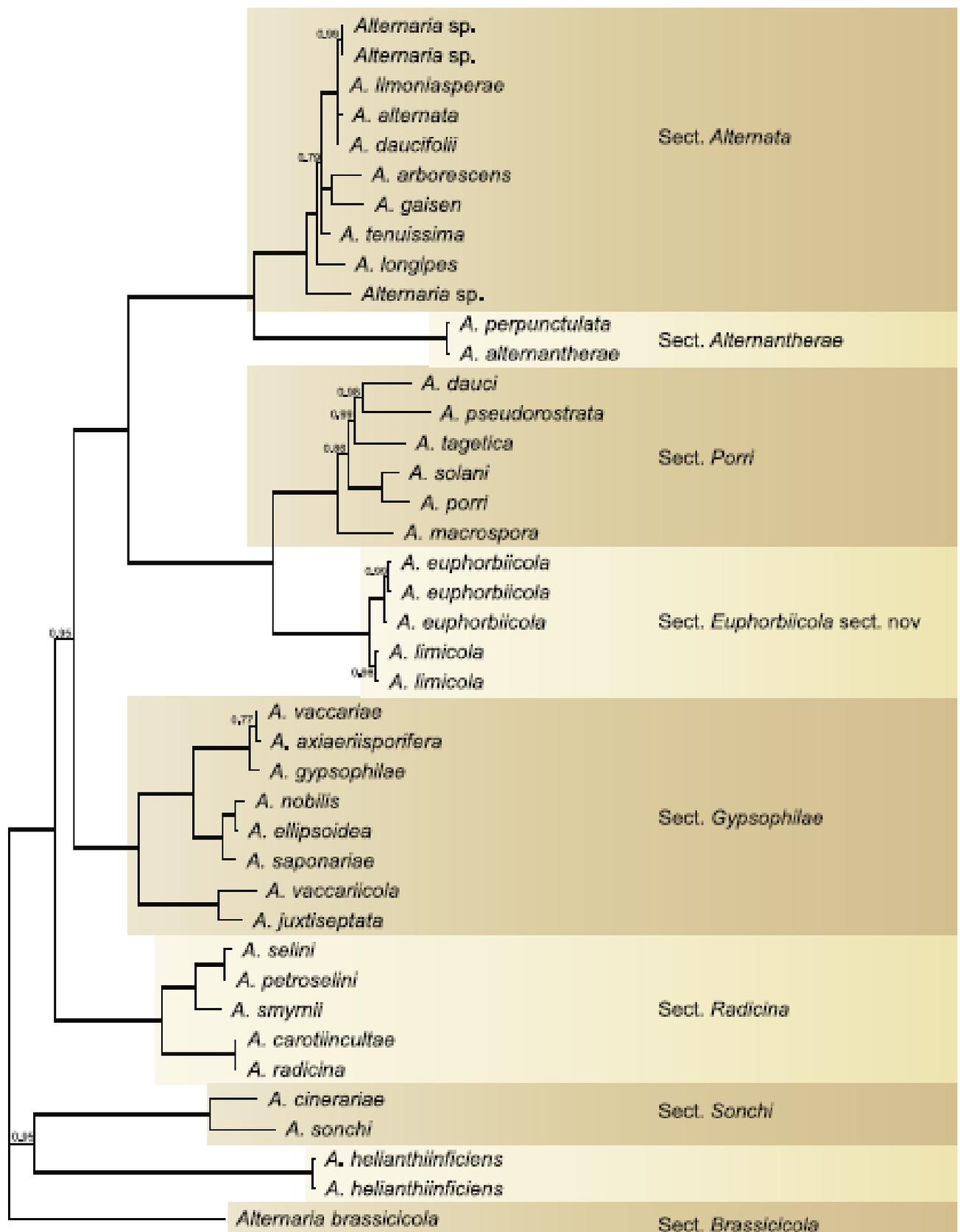


Figure 1 Phylogénie des sections des *Alternaria* spp. basée sur les séquences des gènes GAPDH, RPB2 and TEF1 (D'après Woudenberg *et al.*, 2014).

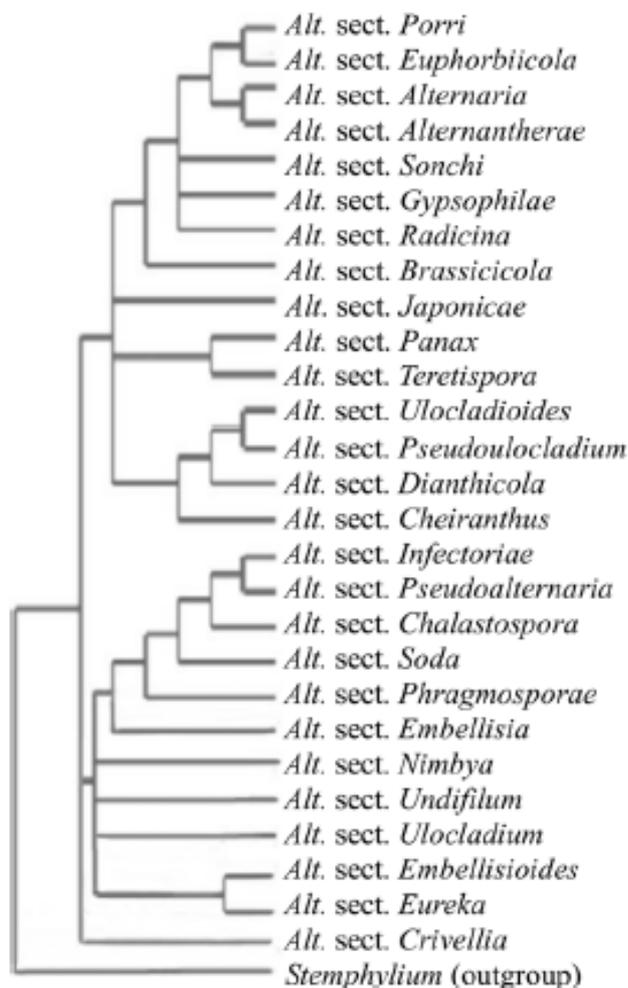


Figure 2 Phylogénie des sections des *Alternaria* spp. (D'après Lawrence et al., 2016).

lycopersicum var. *cerasiforme* (Alef.) Fosberg] et *A. grandis* E.G. Simmons (sur *S. tuberosum* L.). Il a également considéré l'espèce *A. tomatophila* comme étant l'agent causal spécifique le plus commun et le plus répandu de l'alternariose de la tomate. D'un point de vue morphologique, les espèces *A. tomatophila*, *A. cretica* et *A. subcylindrica* sont similaires à *A. solani* et *A. grandis*. Woundenberg et al. (2014) ont retenu *A. grandis* comme une espèce distincte d'*A. solani* et ont également regroupé les espèces responsables de l'alternariose de la tomate (*A. tomatophila*, *A. cretica* et *A. subcylindrica*) au sein d'une même espèce *A. linariae* (Neerg.) E.G. Simmons décrite par Simmons (2007) et dont la gamme d'hôtes couvre maintenant les solanacées, les scurbitacées et les scrophulariacées.

I.2.4. Pathosystème pomme de terre-tomate/*Alternaria* spp.

Au cours de ces dernières années, l'alternariose qui est moins connue que le mildiou causé par l'oomycète *Phytophthora infestans* est devenue dans de nombreuses régions du globe une maladie

préoccupante pour les producteurs de pomme de terre, de tomate ainsi que d'autres Solanacées (aubergine, poivron, piment, etc.). Les dommages causés par l'alternariose sont le plus souvent attribués à deux agents : *A. solani* et *A. linariae* (anciennement *A. tomatophila*) qui peuvent entraîner des réductions sur le rendement de 20 à 80 % pour la pomme de terre (Horsfield et al. 2010) et de 60 à 78 % pour la tomate (Rotem 1994 ; Zitter et Drennan, 2005).

I.2.4.1. Les espèces responsables de l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate et leur distribution géographique dans le monde et en Algérie

L'alternariose est répandue dans la plupart des régions où la pomme de terre et la tomate sont cultivées. Cette maladie tend actuellement à s'étendre à toutes les régions du globe en partie à cause du réchauffement climatique (Kapsa, 2008). Elle est particulièrement répandue dans les pays tropicaux où elles provoquent de graves épidémies (Batista et al., 2006 ; Mantecón, 2007).

Les trois espèces *A. alternata*, *A. solani* et *A. linariae* ont été habituellement considérées comme les principaux agents responsables de l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate. Avec les marqueurs moléculaires, plusieurs espèces ayant de petites conidies comme *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. tenuis* et *A. infectoria* ont été signalées sur la pomme de terre et sur la tomate. De même, plusieurs espèces ayant de grandes conidies ont été également identifiées sur pomme de terre (*A. solani*, *A. grandis* et *A. protenta*) (Orina et al., 2012 ; Gannibal et al., 2014 ; Landschoot et al., 2017) et sur tomate (*A. linariae*, *A. solani* et *A. grandis*) (Rodrigues et al., 2010). En Algérie, trois espèces *A. solani*, *A. linariae* et *A. alternata* ont été signalées comme étant les agents responsables de l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate (Ayad, 2014 ; Bessadat, 2014, 2016). L'espèce *A. grandis* signalée par Simmons (2007) sur tomate est de plus en plus rencontrée sur pomme de terre au Brésil (Rodrigues et al., 2010), en Europe (Landschoot et al., 2017) et sur tomate en Algérie (Bessadat, 2016).

I.2.4.2. Symptomatologie de l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate

Les espèces d'*Alternaria* affectent le feuillage « early blight » et « brown spot », les tiges (pourriture du collet ou de la tige) et les fruits (pourriture des fruits : cas de la tomate) (Walker, 1952). Le symptôme le plus caractéristique de l'alternariose est celui qui se manifeste sur le feuillage et qui se traduit par l'apparition à la surface des feuilles de lésions nécrotiques, de couleur brun foncé, relativement petites, montrant des anneaux concentriques qui leur donnent un aspect de cible « arget spot » (Fig. 3A, B, C) (Agrios, 2005).



Figure 3 Symptômes de l’alternariose de la pomme de terre et de la tomate. **A.** Folioles de pomme de terre montrant des lésions nécrotiques brun foncé. **B.** Foliole de tomate montrant des lésions nécrotiques brun foncé, entourés d’un halo jaunâtre. **C.** Détail d’une lésion nécrotique sur foliole de pomme de terre montrant des anneaux concentriques rappelant l’aspect d’une cible (“target spot”). **D.** Attaque sur tiges de tomate montrant des lésions sombres, lenticulaires semblables à celles des feuilles. **E.** Pourriture sur fruit de tomate dont la surface présente une couche noire et veloutée constituée par le mycélium et les conidies.

Les lésions nécrotiques sont le plus souvent entourées d’un halo jaunâtre (Fig. 3B) (Sherf et Macnab, 1986.). Les premières lésions se manifestent d’abord sur les feuilles inférieures et se déplacent progressivement vers le haut de la plante au fur et à mesure de sa maturité (Rotem, 1994). Au cours de la progression des lésions vers le haut de la plante, il se produit un jaunissement ainsi que la chute des feuilles. Les feuilles sénescentes des étages inférieurs ainsi que les plantes adultes semblent plus sensibles à la maladie (Van der Waals et *al.*, 2001).

Des lésions sombres, lenticulaires, montrant des cercles concentriques semblables à ceux des feuilles peuvent se former sur les tiges (Fig. 3D). Lorsque ces lésions se développent sur les

plantules, elles peuvent évoluer en chancres qui peuvent s'élargir et entourer complètement les tiges entraînant ainsi la mort des jeunes plants (Agrios, 2005 ; Foolad et *al.*, 2008). Des lésions sombres pouvant atteindre 2 centimètres de diamètre et 5 à 6 millimètres de profondeur peuvent se former sur les tubercules de pomme de terre (Agrios, 2005).

Les espèces d'*Alternaria* peuvent causer des pourritures sur les fruits à l'approche de leur maturité. Ces pourritures sur fruit se manifestent par l'apparition à leur surface d'une couche noire et veloutée constituée par le mycélium et les spores (Fig. 3E.). Dans le cas de la tomate, une petite lésion à la surface peut indiquer une propagation étendue de l'infection à l'intérieur du fruit (Agrios, 2005). La plupart du temps, les fruits infectés chutent prématurément (Adhikari et *al.*, 2017).

I.2.4.3. Cycle de l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate

Le cycle de l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate est illustré par la figure 4 (Agrios, 2005). Les espèces phytopathogènes d'*Alternaria* inféodées à la pomme de terre et à la tomate n'ont apparemment pas de stade sexué et, de ce fait, leur conservation se réalise principalement sous forme de mycélium ou de conidies présents au niveau des débris végétaux, du sol, des semences, des tubercules infectés et des solanacées spontanées (Pscheidt, 1985 ; Pelletier, 1988 ; Rotem, 1994 ; Shuman, 1995).

L'inoculum primaire constitué par les conidies hibernantes est projeté par les éclaboussures de pluie ou dispersés par le vent sur les feuilles inférieures de la plante. Des conditions environnementales chaudes et humides (24-29°C) sont propices à l'infection des plantes par les conidies. En présence d'humidité libre et à une température optimale de 28-30°C, les conidies hibernantes germent et donnent en quelques heures un ou plusieurs tubes germinatifs (Kemmitt, 2002 ; Jones et *al.*, 2014). Ces derniers pénètrent les tissus de la plante hôte soit directement à travers la surface intacte de la cuticule, soit indirectement à travers les stomates ou les blessures et ceci avec ou sans la formation des appressoria (Rotem, 1994 ; Solel et Kimchi, 1998 ; Thomma, 2003). Les premières lésions apparaissent au bout d'une période d'incubation de 2 à 3 jours après l'infection. Cependant, cette période varie considérablement en fonction de l'âge des feuilles et la sensibilité des cultivars (Rowell, 1953).

Généralement, une longue période d'humidité est nécessaire pour la formation des conidies secondaires. Celles-ci sont produites au bout d'une période de latence de 3 à 5 jours après l'apparition de lésions (Jones et *al.*, 2014). L'alternance de périodes humides et sèches semble

favoriser la production d'un grand nombre de conidies secondaires que le vent et les éclaboussures de pluie disséminent vers les feuilles saines réalisant ainsi les infections secondaires (Bashi et Rotem, 1975).

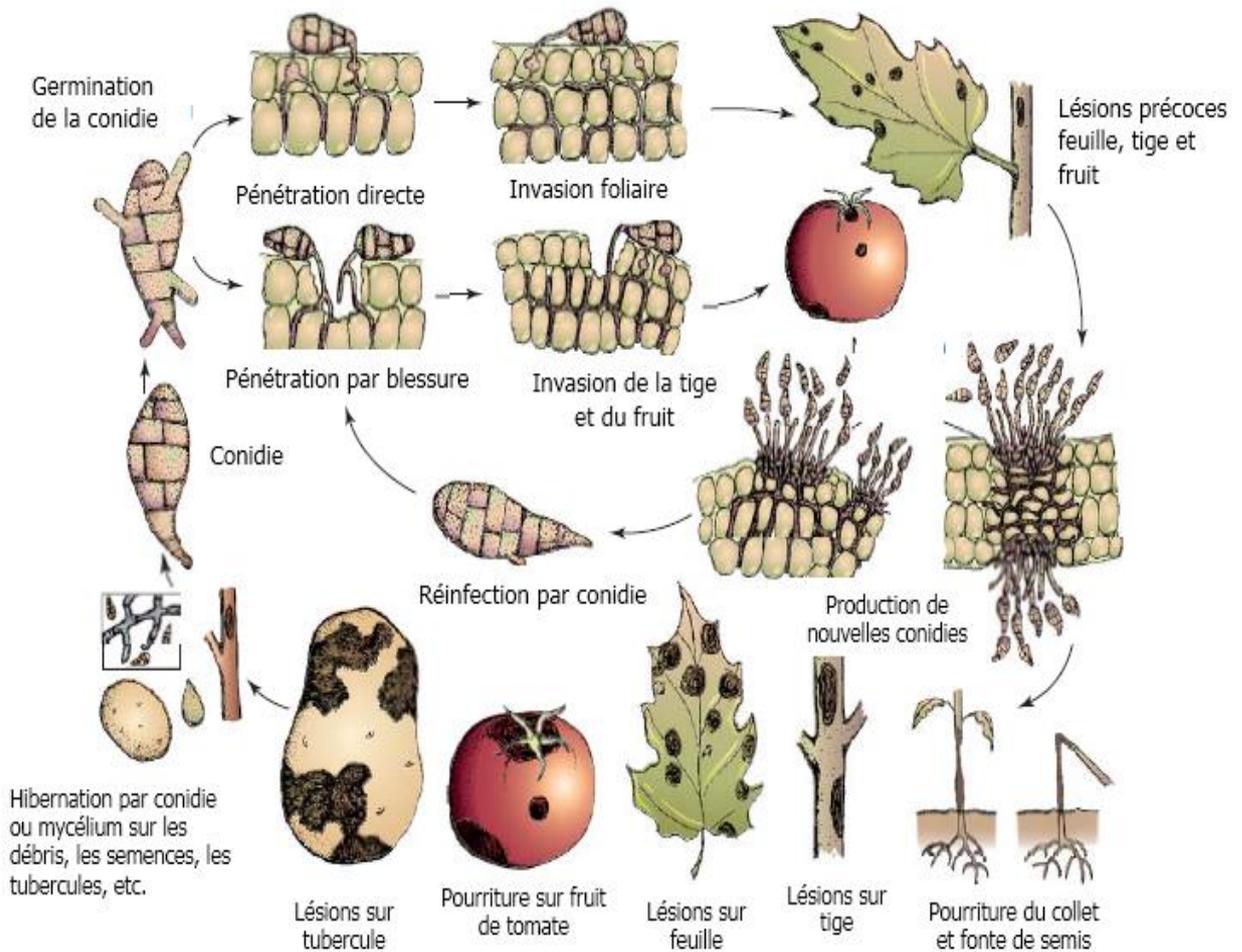


Figure 4 Cycle de l'alternariose de la tomate et de la pomme de terre (D'après Agrios, 2005).

I.2.4.4. Données épidémiologiques de l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate

L'alternariose de la pomme de terre et de la tomate est une maladie polycyclique caractérisée par des cycles répétitifs courts qui sont à l'origine des épidémies (Kemmitt, 2002 ; Jones et *al.*, 2014). Ces dernières surviennent habituellement vers la fin de la saison lorsque les plantes deviennent plus sensibles. En effet, l'alternariose qui est principalement une maladie des organes vieillissants apparaît d'abord sur les feuilles matures des étages inférieurs puis progresse vers le haut au fur et à mesure de la maturité de la plante (Agrios, 2005).

La gravité des épidémies varie avec le lieu et les conditions météorologiques (Van der Waals et *al.*, 2001). L'humidité joue un rôle important dans l'initiation et la progression de la maladie. L'eau libre ainsi que la durée d'humectation des feuilles sont essentielles pour le développement de la maladie (Rands, 1917 ; Guthrie, 1958 ; Holley et *al.*, 1985 ; Tsedaley, 2014). Une longue période humide est nécessaire pour la sporulation qui peut également se réaliser sous des conditions d'alternance de périodes humides et sèches. Les lésions apparaissent généralement rapidement dans des conditions chaudes et humides sur un feuillage âgé et sont généralement visibles dans les 5 à 7 jours qui suivent l'infection (Kemmitt, 2002). Les facteurs comme la maturité rapide du feuillage, la forte charge en fruits, les plantations touffues, les précipitations supérieures à la moyenne et la rosée favorisent le développement précoce de l'alternariose (Horsfall & Heuberger, 1942).

I.2.5. Pouvoir pathogène et spécialisation parasitaire des *Alternaria* spp.

I.2.5.1. Pouvoir pathogène des espèces d'*Alternaria*

Les espèces d'*Alternaria* phytopathogènes font appel à diverses stratégies pour exercer leur pouvoir pathogène. En effet, les *Alternaria* spp. produisent un certain nombre d'enzymes et de métabolites secondaires qui sont impliqués dans la pathogénicité ou la virulence durant l'interaction hôte-pathogène. Divers types de métabolites phytotoxiques comme l'alternariol, l'altersolanol A, l'altertoxine, la macrosporine et la solanapyrone ont été identifiés chez *A. solani* et *A. linariae* (Montemurro and Visconti, 1992 ; Andersen et *al.* 2008 ; Kasahara, et *al.*, 2010). Le profil des métabolites secondaires a été utilisé pour distinguer les espèces d'*Alternaria* à grandes conidies (Andersen et *al.* 2008). C'est ainsi que les souches d'*A. solani*, d'*A. dauci*, d'*A. porri* et d'*A. linariae* se caractérisent par la production des métabolites secondaires suivants : l'altersolanol A, l'altertoxine I et la macrosporine, ainsi qu'un métabolite secondaire inconnue qui est spécifique d'*A. solani*. En outre, plusieurs formes A, B et C de solanapyrone ont été identifiées chez cette dernière espèce (Ichihara et *al.*, 1983). D'une manière générale, le rôle de ces métabolites secondaires dans la pathogénèse n'a pas été déterminée. Selon Montemurro et Visconti (1992) les formes A, B et C de la solanapyrone induisent des symptômes nécrotiques similaires à ceux provoqués par l'alternariose. Cependant, selon Kim et *al.*, (2015), la solanapyrone ne semble pas requise dans la pathogénicité durant l'interaction hôte-pathogène malgré sa forte toxicité.

Les processus enzymatiques qui interviennent dans les infections causées par les espèces d'*Alternaria* sont similaires à ceux provoqués par d'autres agents pathogènes. Généralement, les

champignons phytopathogènes produisent diverses enzymes de dégradation des composés de la paroi cellulaire, comme les pectinases, les cutinases, les cellulases, les xylanases, les glycanases et les protéases qui hydrolysent les polymères de la paroi cellulaire, ce qui facilite leur pénétration dans les cellules hôtes (Annis & Goodwin, 1997 ; Doi et Kosugi, 2004 ; Kubicek et *al.*, 2014 ; Jashni et *al.*, 2015). Parmi les nombreuses enzymes hydrolytiques qui sont produites au cours de l'interaction hôte pathogène, les hydrolases et les protéases interviennent dans la croissance, le développement, la survie et la pathogénicité (Chandrasekaran et *al.*, 2016b). Une sérine protéase extracellulaire et une métalloprotéase ont été mise en évidence chez *A. solani* et semblent être impliquées dans le pouvoir phytopathogène (Chandrasekaran et *al.* 2014, 2016a). Une corrélation positive entre la sécrétion de la protéase et l'agressivité et/ou le développement des lésions nécrotiques a été mise en évidence Chandrasekaran et *al.* 2016b. Cependant, des études moléculaires sont encore nécessaires afin de clarifier le rôle joué par les protéases dans la virulence.

1.2.5.2. Spécialisation parasitaire des espèces d'*Alternaria* à grandes conidies inféodées à la tomate et à la pomme de terre

L'alternariose de la tomate et de la pomme de terre a été habituellement attribuée aux espèces suivantes : *A. alternata* ayant des conidies petites caténulées et provoquant sur pomme de terre et tomate de nombreuses nécroses relativement petites sur le feuillage, *A. solani* (sur pomme de terre) et *A. linariae* (sur tomate) dont les conidies sont grandes, solitaires et pourvues d'un long bec. Ces deux dernières espèces engendrent sur les organes végétatifs des nécroses plus ou moins grandes entourées, le plus souvent, d'un halo jaunâtre.

Avec les marqueurs moléculaires, plusieurs espèces à petites conidies caténulées comme *A. arborescens*, *A. infectoria* et *A. tenuis* ont été signalées sur pomme de terre et sur tomate en plus d'*A. alternata* (Simmons, 2000). De même, plusieurs espèces ayant de grandes conidies non caténulées et pourvues d'un bec ont été également retrouvées à la fois sur pomme de terre (*A. solani*, *A. grandis* et *A. protenta*) (Simmons, 2000 ; Orina et *al.*, 2012 ; Gannibal et *al.*, 2014 ; Landschoot et *al.*, 2016) et sur tomate (*A. linariae*, *A. solani* et *A. grandis*) (Simmons, 2000 ; Rodrigues et *al.*, 2010). Un complexe de trois espèces *A. solani*, *A. linariae* et *A. alternata* a été signalé sur pomme de terre et tomate (Ayad, 2014 ; Bessadat, 2014, 2016). Plus récemment, la présence d'*A. protenta* et d'*A. grandis* a été respectivement rapporté sur pomme de terre par Ayad et *al.*, (2016) et sur tomate par Bessadat, (2016). Ceci suggère que la spécialisation parasitaire des espèces d'*Alternaria* inféodées à la pomme de terre et à la tomate doit être reconsidérée (Ayad et

al., 2019). En outre, il est souvent délicat d'attribuer une espèce donnée à un symptôme et/ou aux caractéristiques morphologiques dans le cas des *Alternaria* inféodés à la pomme de terre et à la tomate.

I.3. Variabilité et diversité génétique des *Alternaria* spp. inféodés à la pomme de terre et la tomate

I.3.1. Variabilité des isolats d'*Alternaria* spp. inféodés à la pomme de terre et la tomate

Plusieurs études ont montré que les isolats d'*A. solani* qui est l'espèce la plus étudiée des *Alternaria* spp. à grandes conidies et qui semble ne se reproduire qu'asexuellement, présentent une grande variabilité dans leur morphologie, leurs caractéristiques culturales, leur physiologie, leur pathogénicité et leur composition génétique (Henning et Alexander, 1959 ; Rotem, 1994 ; Weir et *al.*, 1998 ; Simmons, 2000 ; Martinez et *al.*, 2004 ; Van der Waals et *al.*, 2004). L'hétérocaryose et les mutations naturelles sont les deux phénomènes qui semblent être impliqués dans la variabilité des *Alternaria* spp. (Stall et Alexander, 1957 ; Petrunak et Christ, 1992 ; Van der Waals et *al.*, 2004 ; Chaerani et *al.*, 2006). L'hétérocaryose qui est l'existence de noyaux ayant des génotypes différents au sein d'un même mycélium ou d'une même cellule, a été suggérée comme étant plus importante que les mutations naturelles dans la cause de cette variabilité (Foolad et *al.*, 2008).

Les isolats d'*A. solani* montrent le plus souvent des variations dans la morphologie des hyphes et des conidies. La présence ou l'absence de bec au niveau de la conidie, la longueur du conidiophore, les dimensions des conidies et la compatibilité végétative qui représente un test de mesure de cette variabilité sont des caractéristiques très variables chez les isolats d'*A. solani* (Adhikari et *al.* 2017). Les variations morphologiques sont souvent influencées par les facteurs environnementaux tels que le substrat, l'intensité lumineuse et la température (Vakalounakis et Christias, 1985). Les isolats d'*A. solani* varient tellement dans leurs caractéristiques culturales qu'il est possible de trouver presque autant de morphotypes que le nombre d'isolats testés. La pathogénicité des isolats d'*A. solani* montre également des variations en terme de production de toxines (Martinez et *al.* 2004 ; Adhikari et *al.* 2017).

I.3.2. Diversité génétique des isolats d'*Alternaria* spp. inféodés à la pomme de terre et la tomate

Depuis les années 1980, l'étude de la diversité génétique au niveau moléculaire est devenue possible grâce à l'utilisation des marqueurs moléculaires. Au cours de ces trois dernières décennies, la diversité génétique des isolats d'*A. solani* et d'autres espèces appartenant au genre

Alternaria a été extensivement étudiée par l'utilisation de différents marqueurs moléculaires comme les isozymes et l'ADN polymorphe aléatoirement amplifié (RAPD) (Petrunak et Christ, 1992; Cooke et al., 1998; Sharma et Tewari, 1998; Roberts et al., 2000; Morris et al., 2000; Varma et al., 2006), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN (RFLP) (Akamatsu et al., 1999), le polymorphisme de longueurs de fragments d'amplification (AFLP) (Bock et al., 2002; Pérez Martínez et al., 2004), les marqueurs aléatoires des microsatellites (RAM) (Van der Waals et al., 2004), les espaceurs transcrits internes (ITS), la petite sous-unités mitochondriales (mtSSU) et l'ADN ribosomal (Pryor et Gilbertson, 2000).

La technique de la compatibilité végétative ainsi que les marqueurs moléculaires ont décelé une grande diversité génétique chez les isolats d'*Alternaria* spp. à travers le monde. C'est ainsi que les isolats d'*A. solani* provenant de divers pays montrent un certain degré de diversité génétique, alors que ceux provenant d'un même pays sont souvent génétiquement homogènes (Martínez et al., 2004 ; Van der Waals et al., 2004 ; Varma et al., 2006). Cette dernière observation indique que l'aire de dispersion des espèces d'*Alternaria* peut être confinée à l'intérieur d'une zone géographique limitée (Foolad et al., 2008). Sur la base des marqueurs moléculaires RAPD et AFLP, une spécialisation au niveau de l'hôte a été également détectée sur des isolats d'*A. solani* provenant de pomme de terre et de tomate (Weir et al. 1998 ; Martínez et al., 2004).

I.4. Le concept de races physiologiques chez l'espèce *A. solani*

Les races physiologiques sont définies comme des pathogènes spécialisées par la pathogénicité sur différents génotypes d'un hôte (Agrios, 2005). Jusqu'à présent, il n'existe pas de preuves concluantes concernant la présence de races physiologiques chez les espèces d'*Alternaria*. Les premiers travaux qui ont signalé la présence de races physiologiques chez *A. solani* n'étaient pas basés sur la spécificité différentielle de l'hôte mais plutôt sur la variabilité des isolats. C'est ainsi que l'existence de races physiologiques ("Physiological strains") d'*A. solani* indiquée par Bonde (1929) n'est pas correcte car basée sur la variabilité des caractères physiologiques, morphologiques et écologiques sur milieu artificiel. De même, Henning et Alexander (1959) ont mis en évidence des différences morphologiques, physiologiques et pathologiques chez certains isolats d'*A. solani* obtenus à partir de tomate et d'autres solanacées apparentées. Selon ces auteurs, ces différences semblent être spécifiques de l'hôte. Cependant, cette spécificité pourrait être attribuée à l'hétérogénéité des lignées d'hôtes et à la nature instable des cultures d'isolats mais non à l'existence de races physiologiques. Castro et al. (2000) étudiant la variabilité pathogénique des isolats d'*A. solani* n'ont pas pu mettre en évidence leur réaction hôte spécifique. Actuellement, le

concept de race physiologique chez *A. solani* n'est pas accepté en raison de l'absence de variétés différentielles (Chaerani et Voorrips, 2006 ; Gannibal et al., 2014 ; Adhikari et al., 2017). En plus, aucune race physiologique d'*A. solani* n'est connue ou confirmée à ce jour ce qui suggère qu'il y a une reconnaissance non spécifique de l'hôte par le pathogène (Adhikari et al., 2017).

I.5. Stratégie de lutte contre l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate

L'alternariose de la pomme de terre et de la tomate est une maladie polycyclique pouvant provoquer des épidémies au cours d'une seule saison de culture (Tsedaley, 2014). Ces épidémies sont dues à la capacité des agents causaux (*A. solani* et *A. linariae*) à produire de grandes quantités d'inoculum secondaire (Pasche et al., 2004). La gestion efficace de cette maladie nécessite donc la mise en œuvre d'une approche de gestion intégrée comportant principalement des pratiques culturales adéquates, l'application de fongicides foliaires et l'utilisation de cultivars résistants (Wharton et Kirk, 2007). L'utilisation d'antagonistes microbiens et d'extraits de plantes a été proposée comme méthode de lutte alternative dans la gestion de l'alternariose (Adhikari et al. 2017).

I.5.1. Les pratiques culturales

La méthode de lutte la plus communément utilisée contre les maladies est l'emploi de pratiques culturales adéquates qui visent surtout à réduire la pression des agents pathogènes et les risques de leur propagation. L'élimination des résidus de culture infectée, l'éradication des mauvaises herbes, le maintien de la vigueur de l'hôte par l'intermédiaire d'une fertilisation équilibrée et la réduction de l'humidité des feuilles par des systèmes d'irrigation adéquats constituent les mesures de lutte les plus couramment employées contre les maladies.

Etant donné que les espèces d'*Alternaria* inféodées à la pomme et à la tomate se conservent d'une saison à l'autre au niveau des résidus de cultures, la rotation avec des espèces non hôtes comme les cultures fourragères et les céréales par exemple, réduit la quantité d'inoculum initiale disponible pour les infections primaires (Rotem, 1994 ; Agrios, 2005 ; Schultz et French, 2009 ; Wharton et Kirk, 2007). L'élimination des résidus de culture et la pratique de longues rotations (au moins 2 ans) avec des cultures autres que les solanacées réduit au maximum le potentiel d'inoculum. Des cultures successives de pommes de terre ou de tomate dans une même parcelle entraînent en plein champ l'apparition plus précoce des lésions nécrotiques de l'alternariose (Shtienberg & Fry 1990).

I.5.2. Utilisation de variétés résistantes ou tolérantes

L'utilisation de variétés résistantes ou même tolérantes à l'égard de l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate demeure le moyen de lutte le plus efficace qui tend à réduire la dépendance à l'égard des intrants chimiques et qui présente des avantages environnementaux, sanitaires et financiers importants (Adhikari et al. 2017).

La résistance des variétés de pomme de terre et de tomate à l'alternariose semble être conditionnée par l'âge de la plante (Van der Waals et al., 2001). Cette résistance qualifiée de "temporaire" doit être distinguée de la "résistance vraie" qui n'est pas affectée par l'âge ou la maturité de la plante (Rowell, 1953). Généralement, les tissus sénescents sont plus sensibles à l'alternariose (Fry, 2007). En effet, les nécroses semblent se développer plus rapidement sur les feuilles âgées que sur les jeunes feuilles (Pelletier et Fry, 1989 ; Dita-Rodriguez et al., 2006). Dans le cas de la tomate, l'espèce *A. solani* cause une pourriture du collet et des nécroses sur les organes végétatives « early blight » des plants âgés alors que chez la pomme de terre, le développement des nécroses s'intensifie beaucoup plus à la floraison (Moore & Thomas 1943). Les cultivars qui ont une maturité précoce ont tendance à être plus sensibles que les variétés à maturation tardive (Tymon, 2014). L'utilisation de variétés moins sensibles à l'alternariose réduit dans une certaine mesure la sévérité de la maladie, cependant la résistance de l'hôte n'a aucun effet sur l'apparition initiale de la maladie (Shtienberg & Fry 1990).

Des sources de résistance génétique à l'alternariose ont été identifiées chez la pomme de terre et la tomate. Dans le cas de la pomme de terre, des niveaux de résistance ont été trouvés chez les pommes de terre diploïdes spontanées mais non dans les lignées cultivées de *Solanum tuberosum* qui montrent une résistance faible ou nulle (Rotem 1994). Chez la tomate des niveaux de résistance intéressants ont été identifiés principalement chez les espèces sauvages comme *S. habrochaites*, *S. pimpinellifolium* et *S. peruvianum*, mais pas chez les espèces cultivées de *S. lycopersicum* (Foolad et al. 2008). Les progrès dans la sélection de cultivars résistants à l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate demeurent limités en raison de la nature polygénique de l'hérédité (Chaerani et Voorrips, 2006).

I.5.3. L'utilisation d'antagonistes microbiens et d'extraits de plantes

Plusieurs antagonistes microbiens (bactéries et champignons) et des extraits de certains végétaux ont été testés en vue de contrôler l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate et de rechercher ainsi des méthodes de lutte plus respectueuses de l'environnement. Parmi les antagonistes bactériens, certaines espèces de *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P.*

putida et *P. cepacia*) se sont montrées très efficaces dans la réduction de l'incidence de l'alternariose de la tomate (Joseph et al. 2017). La souche OTPB1 de *Bacillus subtilis* améliore la résistance systémique chez les plants de tomate en induisant la production d'hormones de croissance ainsi que celle des enzymes liées aux mécanismes de défense comme peroxydase, polyphénol oxydase et superoxyde dismutase (Chowdappa et al. 2013).

Certaines espèces fongiques appartenant au genre *Trichoderma* (*T. viride* et *T. harzianum*) réduisent l'incidence de l'alternariose en plein champ (Chowdappa et al., 2013 ; Sarkar et al., 2016). Il a été démontré que l'espèce *T. harzianum* induit une stimulation de la croissance et une résistance systémique à l'égard de nombreuses maladies foliaires de diverses cultures légumières (Papavizas, 1985 ; Sid Ahmad et al., 2000). Chez la tomate, par exemple, la souche OTPB3 semble améliorer la croissance et induire une protection systémique contre l'alternariose (Chowdappa et al. 2013).

Les extraits de plusieurs espèces végétales comme *Crotalaria trichotoma*, *Citrus aurantifolia*, *Azadirachta indica*, *Polyalthia longifolia*, *Datura metel*, *Muntingia calabura* et *Oxalis latifolia* semblent réduire significativement la croissance mycélienne *in vitro* de *R. solani* (Ravikumar et Garampalli, 2013). D'autres espèces végétales comme *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum*, *Ferula foetida*, *Inula racemosa*, *Hemidesmus indicus*, *Rubia cordifolia*, *Glycyrrhiza glabra* et *Saussurea lappa* ont montré une activité antifongique contre les agents causaux de l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate (Yeole et al. 2014)

I.5.4. L'utilisation de fongicides foliaires

Les fongicides de divers groupes chimiques sont largement employés pour lutter contre l'alternariose en raison de l'absence d'autres mesures de contrôle durable et efficace (Gudmestad et al., 2013). L'application de ces fongicides demeurent cependant coûteuse et écologiquement non rationnelle (Adhikari et al., 2017).

I.5.4.1. Types de fongicides utilisés contre l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate

L'utilisation de fongicides est la méthode de lutte la plus couramment employée contre l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate (Douglas et Groskopp 1974 ; Wharton et Kirk, 2007). Plusieurs types de fongicides de contact ou systémiques sont actuellement utilisés pour lutter contre l'alternariose (Adhikari et al., 2017). Les fongicides de contact sont à la base de la plupart des programmes de lutte contre l'alternariose. Les inhibiteurs mitochondriaux ou QoI

(“Quinone Outside Inhibitors”) plus connus sous le nom de strobilurines et les inhibiteurs de la biosynthèse de l’ergostérol appelés encore SI (“Sterol Inhibitors”) ou DMI (“Demethylation Inhibitors”) sont les deux groupes de fongicides systémiques dont certaines matières actives ont été utilisées pour lutter contre l’alternariose de la pomme de terre et de la tomate.

Les fongicides de contact ou de surface qualifiés encore de multisites ou conventionnels ont été développés vers les années 1950. Ils se caractérisent par une bonne action préventive qui empêche le champignon de pénétrer dans la plante hôte en inhibant la germination de ses conidies. Ils agissent principalement en inactivant diverses enzymes ou co-enzymes à groupements thiols, impliquées dans les processus respiratoires et fournissant l’énergie indispensable aux cellules (Leroux et Delorme, 1997). Certains d’entre eux présentent un large spectre d’action incluant des *Ascomycota*, des *Basidiomycota*, ou des *Oomycota* (Leroux, 2003).

Dans le cas des *Alternaria* spp., les fongicides de contact comme le mancozèbe et le chlorothalonil sont appliqués régulièrement à un intervalle de 7 à 10 jours pour protéger les nouvelles pousses et pour éviter le lessivage de ces produits par les pluies. Ces fongicides présentent les avantages suivants : une efficacité fiable et un mode d’action multi-site qui réduit le risque d’apparition de souches résistantes dans les populations d’*Alternaria* spp. inféodées à la tomate et à la pomme de terre (Kemmitt, 2002 ; Adhikari et al., 2017). Parmi les inconvénients de ces fongicides, on peut citer la nécessité de leur application régulière et leur taux d’utilisation relativement élevé ce qui augmente les coûts de production et la pollution environnementale.

Les inhibiteurs mitochondriaux ou QoI (“Quinone Outside Inhibitors”) comme l’azoxystrobine, la pyraclostrobine, la trifloxystrobine, la fenamidone et la famoxidone se sont montrés très efficace à l’égard des espèces d’*Alternaria* inféodées à la pomme de terre et à la tomate. Ces fongicides agissent par inhibition du transport d’électron dans les mitochondries, au niveau du complexe cytochrome bc₁ stoppant ainsi la production d’ATP (Rotem, 1994 ; Gisi et al., 2000 ; Bartlett et al., 2002, Rosenzweig et al., 2008a). En général, ce type de fongicides arrête l’infection par inhibition de la germination des spores. Malgré leur efficacité, l’emploi de ces fongicides présentent cependant le risque de développement de la résistance dans les populations d’*Alternaria*. En effet, des isolats d’*A. solani* qui possèdent la mutation F129L ont montré des niveaux de sensibilité significativement réduits à ces fongicides (Pasche et Gudmestad, 2008). De même, des isolats d’*A. solani* qui portent la mutation G143A qui confère un niveau de résistance élevé à l’égard des strobilurines ont également été détectés en Europe (Kemmitt, 2002). Ceci suggère que les strobilurines n’améliorent pas la lutte contre les espèces d’*Alternaria* comparativement aux fongicides de contact comme le chlorothalonil et le mancozèbe en raison du

risque d'apparition de souches résistantes. C'est pour cela que pour une meilleure efficacité et pour diminuer les risques d'apparition de souches résistantes, les strobilurines doivent être appliquées en mélange avec un fongicide de contact.

Les fongicides qui inhibent la biosynthèse de l'ergostérol qui est indispensable pour la stabilité de la membrane fongique sont subdivisés selon leur mode d'action en deux groupes. Les composés du premier groupe comme les triazoles, les imidazoles, les pyrimidines et les pipérazines inhibent le cytochrome P450 qui intervient pour l'étape C-14 déméthylation. Les composés du deuxième groupe comme la morpholine et les dérivés de la pipéridine interfère avec la C-14 réductase ou avec la Δ^8 - Δ^7 isomérase (Siegel, 1981 ; Baloch et Ahlers, 1984 ; Guan et al. 1992). Parmi les composés de la famille des triazoles qui renferme plusieurs inhibiteurs de la C-14 déméthylation (IDM), le difénoconazole a montré une grande activité à l'égard d'un grand nombre de champignons phytopathogènes appartenant aux phyla *Ascomycota* et *Basidiomycota*. Le difénoconazole est l'un des premiers fongicides inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol qui a montré une efficacité élevée à l'égard des *Alternaria* spp. En effet, ce fongicide a exhibé une activité curative et préventive à l'égard d'*A. solani* bien supérieure à celle du mancozèbe, (Dahmen & Staub, 1992). A cause de ses propriétés protectrices, curatives et éradicatrices, de son large spectre et de son activité durable contre les *Ascomycota* et les *Basidiomycota*, ce composé est souvent intégré dans les programmes de lutte intégré contre les maladies (IDM).

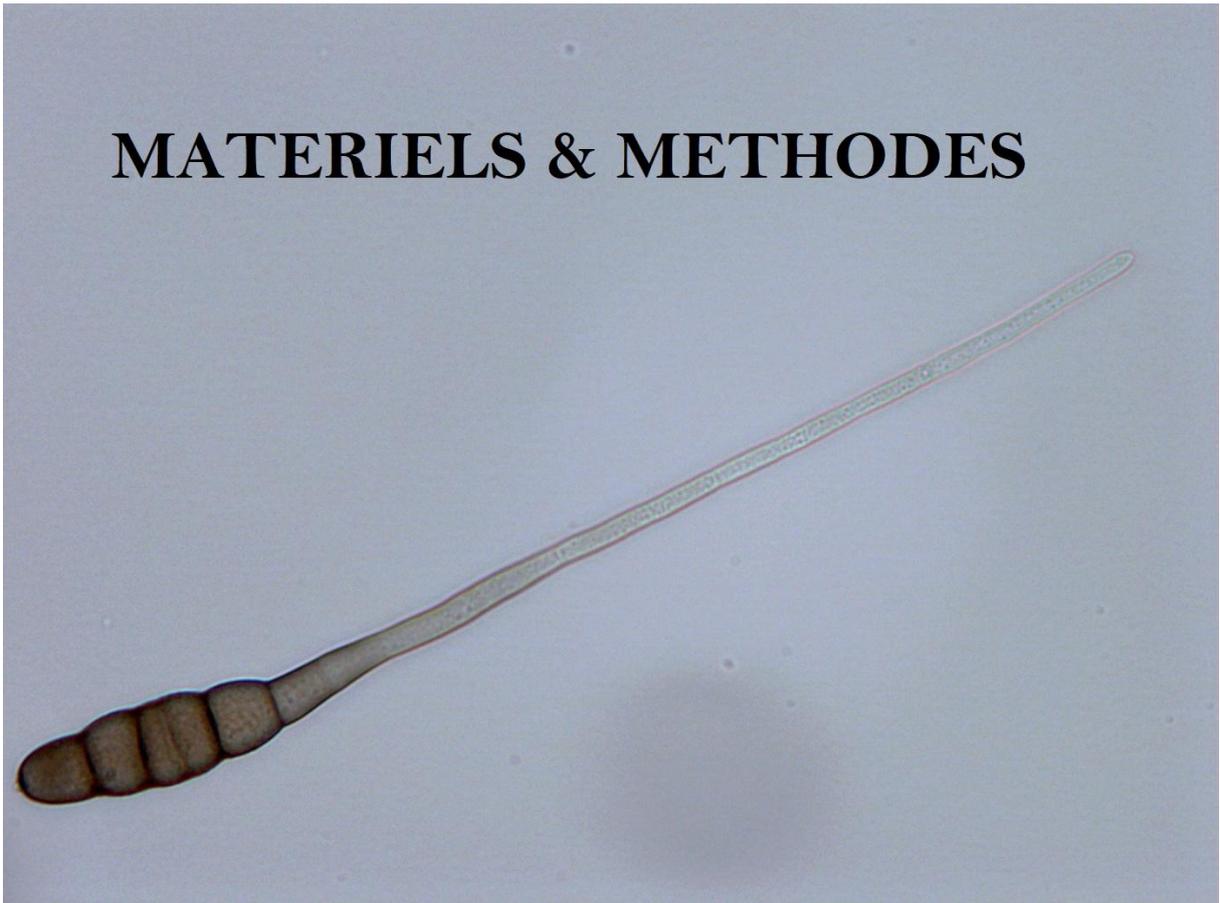
I.5.4.2. Gestion de la résistance aux fongicides chez les populations d'*Alternaria* spp.

Les fongicides ayant un large spectre d'activité ont été les principaux produits utilisés pour la gestion des *Alternaria* spp. L'avantage de ces produits réside dans leur utilisation qui n'a généralement pas entraîné le développement de souches résistantes dans les populations d'*Alternaria* spp. en dépit de leur usage fréquent et prolongé (Tyman, 2014). Au cours de ces trois dernières décennies, il s'est produit un glissement vers l'utilisation de fongicides à spectre étroit afin de réduire les effets négatifs sur la santé humaine et sur l'environnement (Pasche et al. 2004). L'emploi de cette nouvelle génération de fongicides a entraîné le plus souvent le développement du phénomène de résistance chez les agents phytopathogènes (Brent et Hollomon, 1998 ; Leroux et al., 2002). C'est ainsi que plusieurs isolats d'*A. solani* montrant les mutations F129L et G143A ont exhibé respectivement aux USA et en Europe des niveaux de sensibilité significativement réduits aux inhibiteurs mitochondriaux (QoI) (Kemmitt, 2002 ; Pasche et Gudmestad, 2008). De même, l'emploi de l'azoxystrobine depuis la fin des années 1990 a entraîné au niveau international

l'apparition en plein champ de souches d'*A. solani* ayant une sensibilité réduite à ce fongicide (Pasche et al. 2004 ; Rosenzweig et al. 2008b).

Actuellement, le développement de la résistance est devenu un phénomène préoccupant dans la gestion des cultures plus particulièrement lorsqu'il s'agit de fongicides qui affectent un seul site (uni-site) et qui sont utilisés de façon répétée (Delp, 1980). La stratégie la plus courante contre le développement de la résistance des populations d'*Alternaria* spp. consiste en la réduction au minimum du nombre d'application par saison de produits "à risque" et en l'application de fongicides aux modes d'action multi-site et uni-site en alternance ou en mélange (Staub, 1991). L'emploi de fongicides à action uni-site a eu pour conséquence le développement de la résistance (Gisi et al., 1985). Le mélange de produits uni-sites et multi-sites comme le mancozèbe et le chlorothalonil réduit le développement de la résistance aux strobilurines ou à d'autres fongicides uni-sites (Miller et Miller 2004 ; Zitter et Drennan, 2005). La séquence d'application des fongicides s'est également révélée importante pour réduire le risque de développement de la résistance à l'azoxystrobine (Rosenzweig et al. 2008a). D'autres mesures visant à réduire au minimum le développement de la résistance sont le maintien des doses recommandées et la limitation du nombre de traitements afin de réduire la sélection de souches résistantes (Brent et Hollomon, 2007).

MATERIELS & METHODES



II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Distribution des espèces *Alternaria* à grandes conidies sur pomme de terre et tomate selon les zones bioclimatiques algériennes

La distribution de l'alternariose a été évaluée par les fréquences en pourcentage des *Alternaria* spp. à grandes conidies responsables de l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate selon les différentes régions bioclimatiques d'Algérie (humide, sub humide, aride et saharienne) où ces cultures sont cultivées. La présence des espèces d'*Alternaria* à grandes conidies dans les échantillons récoltés a été vérifiée par des observations microscopiques avant l'isolement.

Les champs de tomate et de pomme de terre ont été prospectés pendant les saisons de croissance de ces deux cultures durant trois années successives 2012-2013, 2013-2014 et 2014-2015 et ceci sur 5 sites de chaque wilaya à travers les 12 principales zones de culture de pommes de terre et de tomate. Les localités prospectées ont été sélectionnées sur la base des principales régions productrices de pommes de terre et de tomate en plein champ ou sous serre plastique. Les localités sélectionnées représentent les différentes zones bioclimatiques d'Algérie depuis le littoral jusqu'aux régions semi-arides et arides. Ces localités se répartissent comme suit : Centre (Alger, Tipaza), Est (Bouira, Guelma et Skikda), Ouest (Ain Defla, Chlef, Mascara et Mostaghanem) et Sud (Laghouat, Biskra et El Oued).

II.1.1. Prospection et échantillonnage

Des prospections ont été menées au niveau des deux systèmes de cultures dans 60 localités réparties dans douze régions. Trois à quatre parcelles ont été échantillonnées dans chaque région au cours de 03 campagnes agricoles successives : 2012-2013, 2013-2014 et 2014-2015. La majorité des zones prospectées a été sélectionnée au niveau des principales régions productrices de pommes de terre et de tomate représentées par les différents étages bioclimatiques de l'Algérie : Centre (Alger et Tipaza), Est (Bouira, Guelma et Skikda), Ouest (Ain Defla, Chlef, Mascara et Mostaganem) et Sud (Laghouat, Biskra et El Oued) (fig. 5). L'échantillonnage a été effectué sur des organes de pomme de terre et de tomate présentant les symptômes typiques de l'alternariose : 164 échantillons ont été prélevés essentiellement sur des feuilles de pomme de terre et 83 sur les feuilles, les tiges et les fruits de tomate.

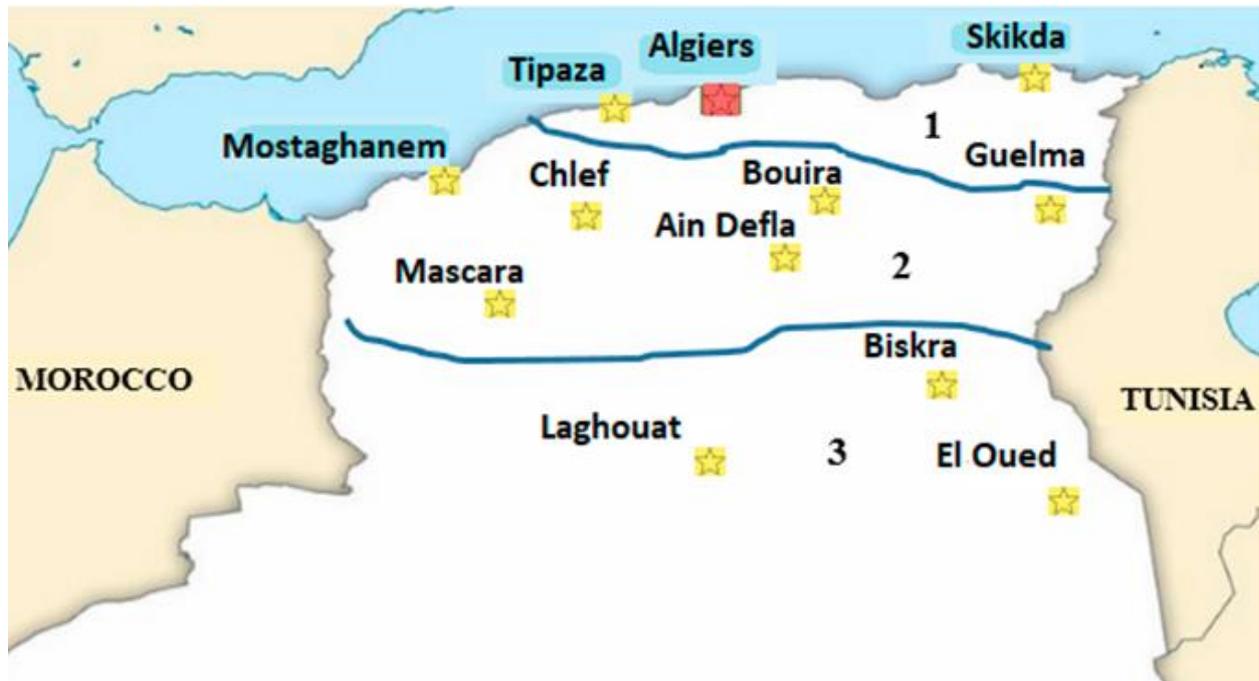


Figure 5 Localités géographiques dans les différentes zones bioclimatiques : 1 = Climat méditerranéen, 2 = climat semi-aride, 3 = climat aride.

II.1.2. Isolement, purification monospore et conservation des isolats

L'isolement a été effectué selon la méthode de Van der Waals et *al.* (2004). De petits morceaux de 3 à 4 mm² ont été découpés sur les bords des lésions nécrotiques infectées, puis désinfectées dans de l'hypochlorite de Sodium (NaOCl) actif à 1 % pendant 3 minutes, ensuite lavés deux fois dans de l'eau distillée stérile et enfin séchés avec du papier absorbant stérile. Quatre morceaux de tissus infectés ont été placés dans des boîtes de Pétri contenant un milieu PDA. Les boîtes sont ensuite incubées à 22°C sous une lumière continue pendant 1 à 2 semaines. La purification des cultures des espèces *Alternaria* spp. a été effectuée entre le 3^{ème} et le 5^{ème} jour d'incubation. Des isolements monospores ont été ensuite réalisés à partir des cultures purifiées des espèces d'*Alternaria* spp. Les cultures monospores sont ensuite incubées sous une lumière NUV avec une photopériode de 12 h d'obscurité et 12 h de lumière pour induire la sporulation.

Pour une utilisation à court terme, les cultures monospores âgées de 12 jours ont été conservées à 4°C dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture PDA. Pour une utilisation à moyen terme, les cultures monospores âgées de 12 jours ont été conservées à 4°C dans des tubes à essai contenant un milieu de culture PDA. Pour une utilisation à long terme, une dizaine d'explants

mycéliens de 8 mm de diamètre ont été conservés à -80°C dans des cryo-tubes de 1,5 ml contenant 800 μl de glycérol stérile à 30%.

II.2. Caractérisation et identification des isolats d'*Alternaria* spp. à grandes conidies par des marqueurs moléculaires

Sur la base des caractéristiques culturales et morphologiques, 156 isolats à grandes conidies sur un total de 247 ont été sélectionnés pour leur caractérisation moléculaire par PCR en utilisant des amorces spécifiques. L'analyse de l'ADN génomique par PCR/RFLP utilisant la double digestion enzymatique (*HaeII* /*RsaI*) d'une portion du gène calmoduline suivie d'un séquençage des gènes de la calmoduline et RPB2.

Tous les protocoles expérimentaux utilisés dans la partie matériels et méthodes sont ceux utilisés par l'équipe de recherche « Fungisem » de l'IRHS de l'université d'Angers.

II.2.1. Extraction et dosage d'ADN

Les isolats cultivés sur un milieu PDA ont été incubés à la température ambiante pendant 10 jours. L'ADN génomique total des échantillons fongiques a été extrait selon la méthode décrite par Goodwin et Lee (1993). Le mycélium a été raclé des cultures âgées de 10 jours puis placé dans des tubes Eppendorf contenant chacun 100 μl de tampon de lyse (Tris-HCl pH=7,2 à 50 Mm, 50 Mm EDTA, 3% SDS, 1% de 2-Mercaptoéthanol). Les tubes Eppendorf ont été placés dans un four à micro-onde à 850 W successivement trois fois pendant 10, 8 et 5s espacés par des intervalles de temps de 10s. Cette étape a été modifiée en laissant les bouchons des tubes Eppendorf fermés à cause de la forte odeur du 2-mercaptoéthanol qui est nocif et en réduisant le temps d'exposition au niveau du four à micro-ondes à 10, 8 et 5s.

Un volume de 300 μl de tampon a été ajouté à chaque tube Eppendorf. Par la suite, les tubes ont été vortexés pendant 3 à 5s puis fermés et incubés dans un bain-marie à 80°C pendant 10 mn après cela 400 μl de Phénol-Chlo-Iso (25 /24 :1) ont été ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont ensuite vortexés pendant 15s puis centrifugés pendant 15 mn à 15 000 tr/min. La phase aqueuse a été récupérée et placée dans un tube Eppendorf stérile auquel on a ajouté 10 μl d'acétate de potassium (5M) et 0,5 vol (180 μl) d'isopropanol. Après incubation dans de la glace pendant 5 mn, les tubes sont vortexés, puis centrifugés pendant 10 min à 10 000 tr/min. Le surnageant est éliminé et le granulé obtenu est lavé dans un volume de 250 μl d'éthanol à 80%. Les tubes sont de nouveau centrifugés pendant 5 min à 10 000 tr/min, puis le surnageant est éliminé. Les pastilles d'ADN

obtenues sont séchées dans le Speed-vac pendant 15 à 20 minutes. Enfin, l'ADN est dilué dans 100 µl de TE (10Mm Tris-Hcl, 0,1mM EDTA, pH8), puis conservé à -20°C.

II.2.2. PCR et Amplification des régions ITS

La paire d'amorces ITS1/ITS4 qui donne une bonne amplification des *Alternaria* spp. a été utilisée pour vérifier la qualité d'ADN (White et al., 1990 ; Garde et al., 1993). Tous les extraits d'ADN des 156 isolats ont été amplifiés. La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume final du mélange PCR de 50 µl. Le mélange a été préparé en fonction du nombre d'échantillons d'ADN à amplifier. Pour un seul échantillon d'ADN, la composition du mélange PCR est de 10 x 1 µl de tampon, 3 x 1 µl de Mgcl2, une unité de dNTPs, une unité de chaque amorce avant et arrière, 0,2 µl de Taq polymérase et 02 µl d'ADN. Le mélange PCR a été dilué dans un volume de 31,8 µl de H2O mQ stérile dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Un volume de 50 µl est distribué dans des microtubes en fonction du nombre d'échantillons.

Les PCR ont été réalisées dans un thermocycleur selon le programme suivant : une période initiale de dénaturation à 94°C et un allongement final de 10 min à 72°C suivi de 34 cycles dans lesquels chaque cycle comprend une étape de dénaturation de 30s à 94°C, une étape d'hybridation de 30s à 58°C et une étape d'élongation de 01mn à 72°C. Une analyse des produits amplifiés a été effectuée sur un gel d'agarose à 1,2 %. Des bandes d'ADN ont été colorées avec du bromure d'éthidium et visualisées sous une lumière ultraviolette. L'échelle d'ADN de 100 pb a été utilisée pour l'estimation de la taille des bandes des produits PCR.

II.2.3. PCR spécifique

En raison de la similitude des caractéristiques morfo-culturelles des espèces d'*Alternaria* à grands conidies, une PCR spécifique a été effectuée pour différencier *A. linariae* des deux espèces *A. solani* et *A. grandis*. Deux paires d'amorces OAsF7 et OAsR6 spécifiques aux deux espèces *A. solani* et *A. grandis* pour l'amplification des 164 bp du gène codant Alt a1 et OatF4 et OatR2 spécifiques des *A. linariae* pour l'amplification des 438 pb du gène codant la calmoduline ont été utilisées (Gannibal et al, 2014). La PCR spécifique a été réalisée dans un volume final de mélange de 25µl ; les conditions utilisées sont les mêmes que pour la PCR/ITS avec un changement de température de l'étape d'hybridation de 30s à 58°C.

II.2.4. PCR/RFLP

Les identifications préliminaires par les amorces spécifiques qui ont séparé *A. linariae* des deux espèces *A. solani* et *A. grandis* ont été complétées par une PCR/RFLP en utilisant les enzymes de restriction *HaeII* et *RsaI* pour différencier les deux espèces *A. solani* et *A. grandis* (Lawrence, 2013 ; Bessadat et al., 2017). Sur les 156 isolats identifiés par PCR et PCR/RFLP, 43 ont été sélectionnés et leur ADN a été amplifié aux loci calmoduline. Les échantillons subissent d'abord une PCR pour l'amplification des loci de la calmoduline à l'aide de la paire d'amorces OatF4 et OatR2 (5'-AGCAAGTCTCTCCGAGTTCAAGTTCAAGG-3' et 5'-CTTCTGCATCATCAYCTGACG-3').

Les produits PCR subissent ensuite une double digestion avec les deux enzymes de restriction *RsaI* et *HaeII*. Un volume de 10 µl de PCR calmoduline est ajouté au Mix Promega de la réaction PCR/RFLP. Le volume final du mélange PCR/RFLP est composé de 1,5µl de chaque enzyme de restriction, 4,5 µl de tampon B10x et 7,5 µl de H₂O mQ stérile. Le mélange est placé pendant une heure dans un four réglé à 37°C. Les produits de digestion ont été mis en évidence par migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 2% et les bandes d'ADN ont été colorées avec du bromure d'éthidium. La taille des fragments d'ADN obtenus a été déterminée au moyen d'un marqueur d'ADN de poids moléculaire connu.

II.2.5. Séquençage et analyse phylogénétique

L'identification des espèces d'*Alternaria* de la pomme de terre et de la tomate a été validée par séquençage des loci de la calmoduline et RPB2 avec la paire d'amorces dont les séquences GGGGWGAYCAYCAGAAGAAGAAGGC et CCCATRGCTTGTGTYRCCCAT. Le séquençage de tous les produits PCR (calmoduline, RPB2) des 43 isolats a été effectué par le GATC Biotech (Allemagne). Pour confirmer la présence d'*A. protenta* parmi les isolats d'*A. solani*, le locus RPB2 de tous les isolats d'*A. solani* a été amplifié. Toutes les séquences des 25 isolats identifiés comme étant *A. solani* après séquençage ont été analysées par l'outil BLAST et comparées à celles des bases de données du NCBI. L'alignement des séquences a été réalisé avec le logiciel Phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008).

II. 3. Caractérisation culturelle et morphologique des *Alternaria* spp. à grandes conidies

Dans le but de mettre en évidence la spécificité parasitaire des isolats, nous avons étudié, en premier lieu, leurs caractéristiques culturelles, morphologiques et pathologiques afin de les comparer à ceux rapportées par la littérature.

Notre collection initiale comptait 247 isolats dont 156 d'*Alternaria* spp. représentés uniquement par les espèces à grandes conidies (Annexe 1). Les isolements ont été réalisés durant la période comprise entre les années 2012–2015. Le code, la plante hôte à partir de laquelle l'isolat a été obtenu, la variété, le lieu d'isolement, l'origine et la localisation géographiques sont indiqués dans l'annexe 1. La collection de 156 d'*Alternaria* spp. qui a fait l'objet de notre étude est présente dans l'annexe 2.

II.3.1 Choix des groupes d'isolats étudiés

Durant les isolements et la purification des souches obtenus, nous avons noté la couleur et la forme de la nécrose, l'aspect cultural, le type de croissance, ainsi que le degré de sporulation pour tous les isolats (Annexe 3). Pour les études ultérieures (caractéristiques culturelles et morphologiques, exigences biologiques, pouvoir pathogène, diversité génétique et résistance aux fongicides) nous avons procédé au choix d'isolats basée sur le diagnostic moléculaire. C'est ainsi que nous avons obtenu une collection constituée de 42 isolats représentant les deux cultures hôtes (pomme de terre et tomate), les deux systèmes de cultures (sous serre et en plein champs), les quatre zones géographiques algériennes représentant les différents étages bioclimatiques (Nord, Est, Ouest et Sud) comme le montre le tableau 5.

II.4. Influence des facteurs biologiques sur la croissance et la sporulation des *Alternaria* spp.

L'identification des espèces d'*Alternaria* est traditionnellement basée sur les caractéristiques culturelles et morphologiques. L'évaluation de ces caractéristiques repose sur l'aspect cultural et morphologique comme la couleur de la culture, le type de mycélium, la pigmentation et la taille des spores. Ces caractéristiques dépendent des exigences biologiques comme le type de milieu de cultures, la température de croissance, le pH du milieu de culture et les conditions photopériodiques pour la sporulation.

II.4.1. Effet des milieux de culture sur la croissance mycélienne

Le choix des milieux de cultures a été fait selon le but recherché qui est de voir s'il y a une préférence d'un milieu par rapport à un autre pour les isolats d'*Alternaria* spp. en termes de croissance mycélienne et de sporulation. Nous avons choisi quatre milieux de cultures : PDA qui est riche en sucre et qui est considéré à la fois comme un milieu de référence pour toutes les espèces du genre *Alternaria* et un milieu général favorisant la sporulation, PCA qui ne comporte pas de sucre et qui est un milieu à base de carotte recommandé pour les espèces d'*Alternaria* à grandes conidies (Simmons, 2007), V8 qui est un milieu utilisé également pour promouvoir la sporulation des champignons ayant des structures pigmentées (Uchida et al., 1986) et TWA (Target Water Agar) qui est un milieu particulièrement pauvre en sucre utilisé pour stimuler la sporulation particulièrement cette même catégorie de champignons (Harris et al., 1986). Les 04 milieux dont la composition est indiquée en annexe 3, sont coulés à raison de 15 ml par boîte de Petri de 90 mm de diamètre. Après solidification, un explant de 9 mm est prélevé et déposé au centre de boîtes de Petri pour chaque milieu de culture. L'explant est récupéré à partir de cultures âgées de 8 jours in cubées à l'obscurité et à une température de 22°C. Trois répétitions sont réalisées pour chaque isolat sur chaque milieu de culture.

Les boîtes inoculées sont incubées dans une chambre de culture à l'obscurité et à une température de 22°C. La croissance radiale est notée depuis le 02^{ème} jour d'incubation jusqu'au 12^{ème} jour selon les isolats avec un intervalle de temps de 02 jours entre les notations. La croissance radiale et l'aspect cultural (couleur, type de croissance et pigmentation) sont notés pour chaque isolat sur chaque milieu de culture.

II.4.2. Induction de la sporulation

La sporulation des isolats a été testée sur les 04 milieux de cultures : PDA, PCA, TWA et V8. Après une période d'incubation de 7 jours à 22°C et à l'obscurité, les boîtes sont soumises à une alternance de lumière NUV/obscurité d'une durée respective de 8 et 16 heures pour stimuler la sporulation (Simmons, 2007). Les premières observations des conidies sont enregistrées à partir du 8^{ème} jour d'incubation. En ce qui concerne les cultures sur les milieux PCA et V8, les cultures mycéliennes sont stressées en les incisant à l'aide d'un scalpel stérile avant leur transfert sous la lumière NUV.

Tableau 5 Liste des 42 isolats des espèces d'*Alternaria* à grandes conidies.

Code	Hôte	Lieu d'isolement	Wilaya (situation géo)
DA001	PDT	Fouka	Tipaza (centre)
DA002	PDT	Fouka -Zirou	Tipaza (centre)
DA003	PDT	Fouka marine	Tipaza (centre)
DA006	PDT	Staouéli-domaine 1.0	Alger (centre)
DA008	PDT	Staouéli	Alger (centre)
DA007	PDT	Staouéli-Ferme N°67	Alger (centre)
DA009	PDT	Staouéli-Ferme N°69	Alger (centre)
DA011	PDT	Fouka	Alger (centre)
DA014	PDT	Staouéli -ITCMI	Alger (centre)
DA019	PDT	Bouira	Bouira (Est)
DA025	PDT	Bouira	Bouira (Est)
DA038	PDT	Ouled Belhadj	Alger (centre)
DA040	Tomate	Hassi Mamèche	Mostaghanem (Ouest)
DA044	PDT	Ghris	Mascara (Ouest)
DA047	PDT	Mostaghanem (Ouest)	Mostaghanem (Ouest)
DA050	PDT	Rouina	Ain Defla (Ouest)
DA052	PDT	Rouina	Ain Defla (Ouest)
DA054	PDT	Bourahla	Mostaghanem (Ouest)
DA057	PDT	Ghris	Mascara (Ouest)
DA060	PDT	Bourahla	Mostaghanem (Ouest)
DA062	Tomate	Stidia	Mostaghanem (Ouest)
DA082	PDT	Ourmes	El Oued (Sud)
DA086	PDT	Sahn Gazel	El Oued (Sud)
DA090	PDT	Mabrouk Jar Ellah	El Oued (Sud)
DA094	PDT	ENSA-Echantillon2	Alger (centre)
DA099	Tomate	Ouled Belhadj	Alger (centre)
DA100	Tomate	Ouled Belhadj	Alger (centre)
DA101	Tomate	Ouled Belhadj	Alger (centre)
DA109	Tomate	Zéralda	Tipaza (centre)
DA111	Tomate	Tipaza (centre)	Tipaza (centre)
DA113	Tomate	Bouati Mahmoud	Guelma (Est)
DA114	PDT	Fedjoudj	Guelma (Est)
DA119	Tomate	Bouchegroune	Biskra (Sud)
DA136	Tomate	Bouchegroune I	Biskra (Sud)
DA140	Tomate	Bouchegroune II	Biskra (Sud)
DA141	Tomate	Laghrous	Biskra (Sud)
DA145	Tomate	Lichana	Biskra (Sud)
DA147	Tomate	Tipaza (centre)	Tipaza (centre)
DA152	Tomate	ENSA	Alger (centre)
DA153	Tomate	ENSA- El Harrach	Alger (centre)
DA154	Tomate	ENSA	Alger (centre)
DA155	Tomate	ENSA	Alger (centre)
DA156	Tomate	ENSA	Alger (centre)

II.4.3. Effet de la température et pH du milieu

Cette étude a été réalisée pour évaluer à l'obscurité l'effet d'une gamme de températures sur la croissance mycélienne et déterminer la température optimale de croissance sur le milieu PDA. En effet, La température ambiante et le pH du milieu de culture sont les deux principaux facteurs qui peuvent exercer une influence directe sur la croissance mycélienne des *Alternaria* spp. Ainsi, le comportement des différents isolats sur le milieu de culture PDA a été étudié sous une gamme de températures : 5°C, 10°C, 20°C, 25°C, 30°C et 35°C (Hubbali et *al.*, 2010). Trois répétitions sont réalisées pour chaque température et pour chaque isolat. Les mesures de la croissance mycélienne sont réalisées après 2, 4, 6, 8 et 10 jours d'incubation aux différentes températures. La croissance mycélienne est évaluée selon la formule de Rappilly (1968) :

$$L = (D-d) / 2.$$

Où

L : croissance radiale (mm)

D : diamètre de la colonie après incubation (mm)

d : diamètre de l'explant (mm)

Pour voir si le pH du milieu de culture influence la croissance mycélienne des isolats, nous avons testé une gamme de pH allant de 04 à 10 sur milieu PDA sous une température de 20°C et à l'obscurité. Le pH a été ajusté en utilisant de l'acide chlorhydrique (HCL 0,5N) ou une solution alcaline d'hydroxyde de sodium (NaOH 0,5N).

II.4.4. Mensuration des spores

Une mensuration de 100 conidies est réalisée sur tous les isolats ayant sporulé. La largeur de l'hyphe, la longueur et la largeur ainsi que la longueur du bec de la conidie et le nombre de septa transversales et verticales sont évalués (Simmons, 2007).

II.4.5. Analyse statistique

Les analyses statistiques des résultats sont effectuées à l'aide d'un logiciel Statistica version 6.0, qui permettent une analyse de la variance sur la base de la plus petite variation significative et le classement des isolats en groupes homogènes (Test LSD).

II.5 Analyse de la variabilité génétique au sein de l'espèce *A. solani* par des marqueurs de type microsatellites

II.5.1 Analyse du polymorphisme du locus caractérisé

Afin d'étudier la diversité génétique au sein de l'espèce *A. solani*, nous nous sommes intéressés aux nouveaux outils d'analyse polymorphique par les marqueurs de type microsatellites. Benichou et al.(2008) ont isolés 11 locus microsatellites polymorphes chez *A. dauci*. Les tests d'amplification interspécifique et de séquençage des amplicons résultants ont montré que certains de ces microsatellites pouvaient être utilisés chez différentes espèces telles que *Alternaria solani*. Nous avons donc testé 03 locus microsatellites (Mic 23, Mic 36 et Mic 127).

Le caractère polymorphe des 03 locus microsatellites (Mic 23, Mic 36 et Mic 127) a été évalué sur un échantillonnage de 21 isolats d'*A. solani* dont 18 proviennent de différentes régions d'Algérie et 03 de Hongrie et collectées sur pomme de terre (3 *A. solani*, 2 *A. linariae*, 1 *A. protenta*) et une souche de référence CBS 11041 de *A. solani*. Le lieu et hôte d'origine des isolats typés sont donnés dans le tableau 6.

L'ADN des différents isolats d'*A. solani* a été amplifié avec les 06 différentes paires d'amorces (Tableau 7 – voir la liste des locus testés). Un polymorphisme de taille à chaque locus a été évalué. Les produits d'amplification ont été séparés sur gel d'acrylamide 2 % et visualisés après révélation BET.

II.5.2 Génotypage du marqueur microsatellite

Cette technique consiste à amplifier des régions polymorphiques à motif répété dans le génome (microsatellites), génère des fragments de longueur variable d'un allèle à l'autre. En marquant l'une des amorces utilisées dans la PCR avec un fluorochrome, nous pouvons déterminer ensuite, par électrophorèse capillaire, la longueur exacte de chaque microsatellite étudié chez un individu.

Tableau 6 Liste des isolats utilisés pour le test microsatellites.

Code	Hôte	Lieu d'isolement	Région	Espèce
DA008	PDT	Staouéli	Alger (centre)	<i>A.solani</i>
DA011	PDT	Fouka	Alger (centre)	<i>A.solani</i>
DA014	PDT	Staouéli -ITCMI	Alger (centre)	<i>A.solani</i>
DA019	PDT	Bouira	Bouira (Est)	<i>A.solani</i>
DA025	PDT	Bouira	Bouira (Est)	<i>A.solani</i>
DA050	PDT	Rouina	Ain Defla (Ouest)	<i>A solani</i>
DA057	PDT	Ghris	Mascara (Ouest)	<i>A.solani</i>
DA090	PdT	Mabrouk Jar Ellah	El Oued (Sud)	<i>A solani</i>
DA094	PDT	ENSA-Echantillon2	Alger (centre)	<i>A solani</i>
DA113	Tomate	Bouati Mahmoud	Guelma (Est)	<i>A solani</i>
DA114	PdT	Fedjoudj	Guelma (Est)	<i>A solani</i>
DA136	Tomate	Bouchegroune I	Biskra (Sud)	<i>A solani</i>
DA140	Tomate	Bouchegroune II	Biskra (Sud)	<i>A solani</i>
DA141	Tomate	Laghrou	Biskra (Sud)	<i>A solani</i>
DA145	Tomate	Lichana	Biskra (Sud)	<i>A solani</i>
DA062	Tomate	Stidia	Mostaghanem (Ouest)	<i>A.protenta</i>
DA082	PdT	Ourmes	El Oued (Sud)	<i>A.protenta</i>
DA086	PDT	Sahn Gazel	El Oued (Sud)	<i>A.protenta</i>
CBS	Solanum aviculare		Non connu	<i>A solani</i>
AD134	PDT		Hongrie	<i>A linariae</i>
AD155	PDT		Hongrie	<i>A protenta</i>
AD206	PDT		Hongrie	<i>A solani</i>
AD207	PDT		Hongrie	<i>A linariae</i>
AD208	PDT		Hongrie	<i>A solani</i>
AD232	PDT		Hongrie	<i>A solani</i>

Tableau 7 Séquences des couples d’amorces des 03 locus microsatellites choisis.

Mic_23_up	ACA-AGA-CAC-GGC-CAC-CTT
Mic_23do	AGT-CTA-TGT-GCT-CTG-GGC
Mic_23do2	GCT-GAC-GGT-GTG-GCG-CGG
Mic_36up	TTC-GTC-CGC-TCA-CCT-CCT
Mic_36up2	CTC-ACT-CTC-ACC-CCA-CCC
Mic_36_do	TCG-CCA-GTA-AAG-CAG-AAG-C
Mic_36do2	AAG-CGA-AGT-AAC-AAA-GTC
Mic_127up	CTC-TCG-TTC-AAA-CGC-CAT
Mic_127up2	TCA-GTC-GTG-ACC-ACT-GCA
Mic127do	CTT-CAC-GAT-CCC-CTG-GGC
Mic127do2	TGC-AGA-CTG-TTG-GGT-TGC-AAG

Liste des locus testés :

- locus Mic 23 : on a testé les couples 23 up - 23 do (1) et 23 up - 23 do2 (2)
- locus Mic 36 : on a testé les couples 36 up - 36 do (3) et 36 up - 36 do2 (4)
- locus Mic 127 : on a testé les couples 127 up - 127 do (5) et 127 up - 127 do2 (6)

II.5.2.1 Amplification par PCR et séquençage du locus Mic 127

La procédure met en œuvre l’amplification initiale par PCR d’une séquence-cible avec une amorce sens fluo M13. L’amplicon d’ADN obtenu est ensuite utilisé comme matrice pour la réaction de séquençage capillaire par un marquage direct des fragments cibles.

Nous avons donc amplifié nos échantillons au nombre de 21 par une amorce sens fluo M13 et l’amorce anti sens qui ont servies pour l’amplification des marqueurs microsatellites. Une amplification des ADN qui présentaient un polymorphisme avec les amorces microsatellites, est réalisée avec 04 unités de Tampon 10x5 µl, 1.6µl de Mgcl2, 2 unités des dNTPs, 0.3µl de chaque amorce (sens fluo M13 et anti sens), 0.8µl de l’amorce sens non fluo afin de commencer l’amplification de l’ADN et laisser la suite à l’amorce sens fluo, prendre le relais et surtout terminer le processus ; la nécessité de 0.2µl de Taq polymérase est évidente et le tout est bien mélangé dans 8.72µl d’H2O mQ stérile pour un volume total de 17µl. Ce dernier volume est

réparti dans chaque micro-tube à thermocycleur nécessitant 03 μl d'ADN par échantillon avec un témoin dans lequel on met 03 μl d'eau afin d'obtenir un volume final de 20 μl par réaction.

Pour les conditions d'amplification au thermocycleur, nous avons adopté le programme de PCR classique avec une température d'amplification de 54.5°C.

II.5.2.2 Vérification de l'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose

Avant de passer à l'étape du séquençage capillaire des fragments amplifiés avec l'amorce M13 fluo, nous devons d'abord confirmer la réussite de la PCR par électrophorèse sur gel d'agarose à 02 %.

II.5.2.3 Séquençage capillaire d'amplifias avec l'amorce fluo M13

Après la confirmation de l'amplification de nos ADN par l'amorce M13 fluo, nous procédons à une dilution au 1/40ème. Nous procédons en premier lieu à une dilution des produits PCR à 1/8ème en rajoutant 7 μl d'H₂O stérile à 1 μl de produit PCR pour chaque échantillon. Un volume de 2.4 μl de cette première dilution est ajouté à 9.6 μl du mélange de 9.4 μl de Formamide et 0.2 μl de marqueur moléculaire. Une 2ème dilution au 1/5ème est donc réalisée pour chaque échantillon. Les puits contenant donc le mix produit PCR dilué au 1/40ème est incubé à 95°C pendant 5 mn dans un thermocycleur pour la dénaturation d'ADN.

A la fin de l'incubation, nous laissons les puits se refroidir lentement. Nous s'assurons de l'absence de bulles dans les puits. Celles-ci sont susceptibles d'entrer dans les capillaires et les endommager lors de l'injection. La plaque à puits est donc placée dans l'analyseur génétique automatisé et le logiciel de collecte de données est programmé en accord avec les spécifications du fournisseur.

II.6. Test pathologique et spécialisation parasitaire des espèces *Alternaria* à grandes conidies sur leurs hôtes pomme de terre et tomate

Des inoculations artificielles sur folioles détachées et sur plantes entières ont été effectuées dans le but de confirmer la pathogénicité des espèces d'*Alternaria* à grandes conidies. Deux variétés par plante hôte (pomme de terre et tomate) ont été choisies.

II.6. 1. Matériel végétal

Deux variétés couramment utilisés par les agriculteurs ont été choisies : Spunta et Sarpo Mira pour la pomme de terre et Saint pierre et Marmande pour la tomate. Pour l'obtention des plants de pomme de terre, des tubercules sont semés directement dans un substrat contenant 2/3 de terre et 1/3 de terreau amendé par un engrais N-P-K (15-15-15) (Figs. 6A et B). En ce qui concerne la tomate, des graines sont d'abord incubées pendant 5 jours dans une chambre humide à 25°C pour favoriser leur germination, puis semées sur une plaque alvéolaire contenant uniquement du terreau. Après deux semaines, les plantules de tomate seront transplantées dans des pots contenant le même substrat utilisé pour la pomme de terre (Figs. 6C et D).



Figure 6 Semis des variétés de pomme de terre et de tomate. **A.** Tubercules de pomme de terre pré-germés. **B.** Tubercules de pomme de terre semés en pots. **C.** Plantules de tomate sur plaque alvéolaire. **D.** Plants de tomate transplantés dans des pots.

II.6.2. Matériel fongique

Afin de réaliser une inoculation croisée sur les deux cultures pomme de terre et tomate, nous avons choisi des isolats issus des deux cultures selon leur pouvoir sporulant. L'ensemble de ces isolats est indiqué dans le tableau 8.

Tableau 8 Isolats utilisés lors des inoculations artificielles croisées.

Espèces	Code des isolats	
	Issus de pomme de terre	Issus de tomate
<i>Alternaria solani</i>	DA008, DA009 et DA114	DA140, et DA141
<i>Alternaria linariae</i>	DA002, DA003, et DA100	DA153
<i>Alternaria grandis</i>	DA060	DA099 et DA152
<i>Alternaria protenta</i>	DA082	DA062

II.6.3. Préparation de l'inoculum

A partir des cultures sporulantes âgées de 15 jours, des suspensions de conidies sont préparées. Un volume de 20 ml d'eau distillée stérile est versé dans chaque boîte de culture sporulée. La surface de ces cultures est raclée à l'aide d'une pipette pasteur courbée pour récupérer le maximum des conidies. Les concentrations finales des suspensions sont ajustées à 10^4 conidies / ml. à l'aide d'une cellule de Malassez, Les suspensions de conidies sont récupérées dans des tubes à essai auxquels on a ajouté une goutte de tween 20 pour assurer un adhésion au niveau des tissus los de l'inoculation.

II.6.4. Inoculation artificielle des folioles détachées de pomme de terre et de tomate

Pour vérifier la spécialisation parasitaire des espèces étudiées sur leurs hôtes respectifs, nous avons adopté la technique d'inoculation des folioles détachées, avec des suspensions de conidies décrite par plusieurs auteurs (Rodrigues et *al.*, 2010 ; Ganie et *al.*, 2013 ; Spoelder et *al.*, 2013 ; Gannibal et *al.*, 2014). Des folioles saines des variétés Spunta et Sarpo Mira pour la pomme de terre et Marmande et Saint Pierre pour la tomate sont rincées avec de l'eau distillée, séchées sur du papier absorbant, puis placées dans des boîtes de Petri en verre de 9 cm de diamètre contenant un

papier buvard humidifié reposant sur un grillage plastique servant de support pour éviter la pourriture des feuilles en contact avec l'eau. Les pétioles des folioles sont entourés par du coton humidifié pour les garder turgescentes durant toute la durée de l'expérimentation. A l'aide d'une micropipette, des gouttes sont prélevées de la suspension de conidies et déposées sur la face supérieure des folioles (Fig. 7A). Les boîtes de Petri sont ensuite incubées en chambre de culture sous une lumière blanche continue à une température ambiante de 20 ± 2 °C, pendant toute la durée du test. Deux et quatre répétitions sont respectivement réalisées pour chaque isolat et pour chaque variété.

II.6.5. Inoculation artificielle des plants entiers de pomme de terre et de tomate

L'Inoculation artificielle des plants entiers de pomme de terre et de tomate a été réalisée selon les techniques décrites par Fritz (2005) et Stammler et *al.* (2014). L'inoculation artificielle est réalisée soit par pulvérisation de toutes les parties aériennes des plants à l'aide d'un pulvérisateur manuel, soit en déposant à l'aide d'une micropipette quelques gouttes de la suspension sur les folioles des plants dans le cas des isolats dont la sporulation est faible (Figs. 7B et C). Les plants inoculés sont préalablement pulvérisés avec de l'eau pour assurer une meilleure adhésion des conidies et favoriser ainsi l'infection. Après inoculation, les plants sont recouverts avec un film de polyéthylène pendant 48 heures pour maintenir une humidité saturante nécessaire à l'infection ; des pulvérisations régulières d'eau sont effectuées deux à trois fois par jour pendant toute la durée de l'essai (Fig. 7D).

II.6.6. Notations de la maladie

Les notations des inoculations artificielles sur folioles détachées ont été effectuées selon une échelle visuelle d'extension des nécroses (Fig. 8) et une échelle de notation allant de 1 à 10 pour l'évaluation de la maladie (Tableau 9) (Duarte et *al.* 2013).

L'expérimentation est réalisée sur deux variétés pour chaque plante hôte (pomme de terre et tomate) dans une serre en verre du Département botanique de l'ENSA.



Figure 7 Inoculation artificielle croisée. **A.** Foliolles détachées de tomate et de pomme de terre. **B.** Plantes entières de pomme de terre. **C.** plantes entières de tomate. **D.** Plants recouvert d'un film de polyéthylène.

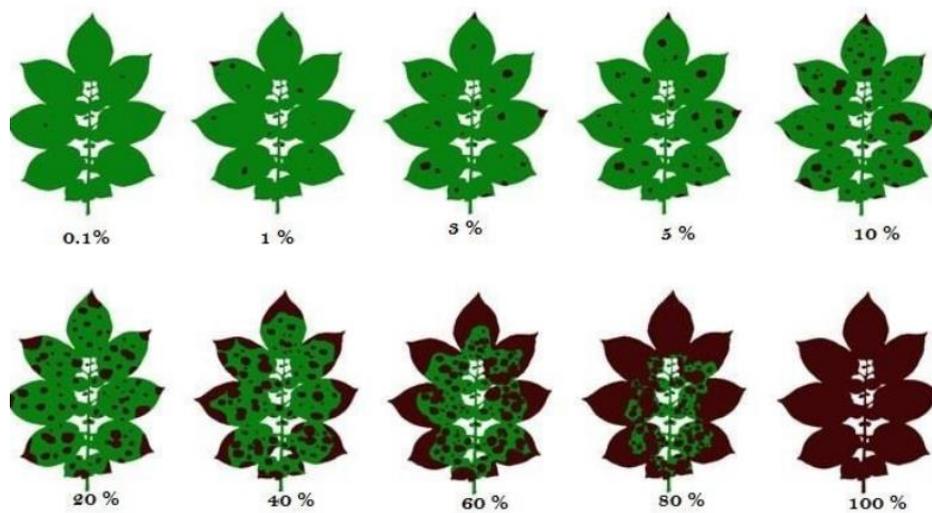


Figure 8 Echelle de notation visuelle de la sévérité de l'alternariose sur feuille de pomme de terre (Duarte *et al.*, 2013).

Tableau 9 Echelle de notation de la maladie sur folioles détachées.

Note	% de lésions par feuille infectée
1	0.1%
2	1 %
3	3 %
4	5 %
5	10 %
6	20 %
7	40 %
8	60 %
9	80 %
10	100 %

Pour les inoculations effectuées sur les plants entiers de pomme de terre et de tomate, une échelle de notation visuelle de 1 à 9, proposée par le CIP (OEPP, 2008) a été utilisée pour évaluer la sévérité de la maladie avec 1 correspondant à l'absence totale des symptômes et 9 à la mort du plant (Tableau 10).

Tableau 10 Echelle de notation de la maladie de 1 à 9 sur plants inoculés.

Note de l'échelle	Description des symptômes
1	Pas de symptômes visibles
2	1 à 10 % par plant
3	10 % des feuilles mortes
4	25 % des feuilles mortes
5	50 % des feuilles mortes
6	75 % des feuilles mortes
7	90 % des feuilles mortes
8	97,5 % des feuilles mortes
9	Toutes les feuilles sont mortes

Les valeurs de l'AUDPC ou aire sous la courbe de progression de la maladie nous permettent d'évaluer l'intensité de la maladie. Ces valeurs expriment la quantité totale de la maladie sur une période de temps. L'AUDPC est calculée selon la formule définie par Shaner et Finney (1977) indiquée ci-dessous :

$$\text{AUDPC standardisée} = \sum^n [(X_i + X_{i+1}) / 2] (t_i - t_{i-1})$$

Où :

n = Nombre total d'observations ;

x_i = index de la maladie de chaque observation ;

(t_i-t_{i-1}) = temps séparant deux observations consécutives.

II.6.7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des résultats sont effectuées à l'aide d'un logiciel Statistica version 6.0 qui permettent une analyse de la variance (ANOVA) et un classement en groupes homogènes. Ces résultats sont traduits en histogrammes pour une meilleure visualisation et interprétation.

II.7. Etude *in vitro* des niveaux de résistance des *Alternaria* spp. de la pomme de terre et de la tomate aux deux fongicides : azoxystrobine et difenoconazole

Le but de cette étude est d'évaluer la résistance des populations d'*Alternaria* spp. isolées de la pomme de terre et de la tomate vis-à-vis des fongicides couramment utilisés par les agriculteurs en Algérie.

Les seules méthodes actuellement adoptées en Algérie pour protéger les cultures de pomme de terre et de tomate sont l'analyse sanitaire des lots de semences et la lutte chimique. Parmi les fongicides actuellement utilisés en Algérie pour gérer l'alternariose de la pomme de terre et de la tomate on peut citer les strobilurines qui sont des inhibiteurs mitochondriaux ou QoI ("Quinone Outside Inhibitors") et les triazoles qui sont des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (IBS).

II.7.1. Préparation des solutions de fongicides

Les matières actives utilisées sont l'azoxystrobine (250 g/l d'ingrédient actif ; Syngenta Crop Protection Inc) la famille des strobilurines et le difenoconazole (250 g/l d'ingrédient actif ; Syngenta Agro SAS, Suisse) pour les triazoles.

Pour avoir un effet *in vitro* avec l'azoxystrobine sur la croissance mycélienne, nous lui avons ajouté un inhibiteur de l'oxydase alternative comme l'acide salicylhydroxamique (SHAM) à 28 mg/L. Pour les deux matières actives, des solutions mères à 10 g/l dans l'éthanol ont été réalisées. Des dilutions sont ensuite effectuées stérilement pour obtenir des concentrations suivantes : 1 mg/l, 10 mg/l et 100 mg/l (Pasche et *al.*, 2004 ; Tymon, 2014). Ces concentrations sont incorporées à un milieu de culture PDA refroidi à 50°C environ après l'autoclavage

II.7.2. Mesure de la croissance mycélienne des colonies

Le milieu PDA supplémenté ou non par les différentes matières actives est repiqué avec des explants mycéliens de 8 mm de diamètre représentant l'inoculum fongique. Les explants mycéliens sont prélevés à la périphérie des cultures âgées de 7 jours. Les boîtes ensemencées sont ensuite incubées à l'obscurité et sous une température de 22°C. Les observations sont effectuées à partir du 5^{ème} jour d'incubation puis au 7^{ème}, 12^{ème} et 20^{ème} jour après l'ensemencement. L'activité des fongicides sur la croissance mycélienne a été évaluée par la mesure du diamètre de la colonie et ceci pour chaque concentration du fongicide (Fig. 9B). Les diamètres moyens sont comparés à ceux des témoins et le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est ensuite calculé selon la formule suivante :

$$I = 100 \times (A - B) / A$$

Où

I = pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne

A = diamètre moyen des colonies témoins

B = diamètre moyen des colonies traitées.

La CI 50 (concentration nécessaire pour inhiber 50% de la croissance mycélienne) qui permet de caractériser le niveau de sensibilité ou de résistance d'une souche à l'égard d'une matière active a été définie à partir de la droite de régression linéaire entre les logarithmes décimaux des concentrations de fongicides (en abscisse) et les pourcentages d'inhibition de la croissance transformés en valeurs probit (en ordonnée), (Fig .9A).

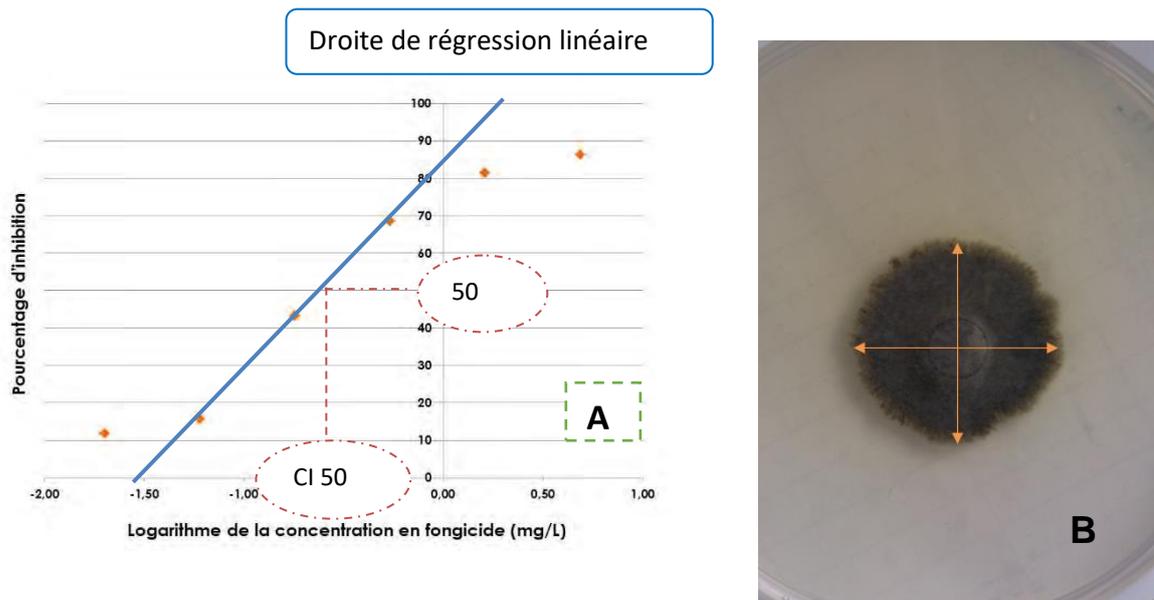


Figure 9 Evaluation de la croissance mycélienne.

A. Principe du calcul de la CI50. **B.** Mesure du diamètre moyen d'une colonie.

Différentes classes de phénotypes pour les fongicides (azoxystrobine et difenoconazole) ont été ainsi établies en fonction du niveau de résistance des souches qui est calculé par le rapport de la CI50 mesurée pour un individu donné sur la CI moyenne des souches considérées comme sensibles ensuite interpréter selon l'échelle décrite par Leroux et *al.*, (2007) et Leroux et Walker (2011) comme suit :

0-0,5 mg/l = Hypersensible (HS)

0,5-2,5 mg/l = Sensible (S)

2,5-25 mg/l = Légèrement résistant (LR)

25-100 mg/l = Moyennement résistant (MR)

> 100 mg/l = Hautement résistant (HR)

0-0,5	0,5-2,5	2,5-25	25-100	>100
HS	S	LR	MR	HR

II.7.3. Mesure de l'élongation des tubes germinatifs

Les conidies sont mises en suspension à partir de cultures âgées de 7 jours. A l'aide d'une aiguille et sous la loupe binoculaire, les conidies sont récupérées et déposées dans un microtube contenant 500 µl d'eau stérile et 0.1 µl de tween 20. La concentration de la suspension de conidies est ajustée à 10³ spores/ml à l'aide d'une cellule de Malassez. La suspension est ensuite étalée à la surface du milieu de culture PDA additionné de chaque matière active (azoxystrobine ou difenoconazole) et contenu dans des boîtes de Petri de 8,5 cm de diamètre. Un témoin constitué par des conidies traitées à l'eau a été réalisé. Après 24 heures d'incubation des boîtes, la germination des spores et l'élongation de leurs tubes germinatifs sont évaluées à l'aide d'un microscope étalonné. Le pourcentage de spores germées est estimé sur 30 conidies pour chaque traitement. L'élongation des tubes germinatifs a été évaluée sur 30 conidies germées sur un échantillon de 100 spores pour chaque traitement et pour chaque souche. L'expérience a été répétée deux fois. Le pourcentage de résistance est calculé selon la formule suivante (Leroux et Greddt, 1982) :

$$R = 100 \times Gt/Go$$

Où :

R = pourcentage de résistance

Gt = pourcentage de germination à t ppm du fongicide

Go = pourcentage témoin de germination sans fongicide.

Comme précédemment, on détermine les concentrations réduisant de 50 % (CI50) la germination des conidies et l'élongation des tubes germinatifs.

II.7.4. Mesure de la croissance des hyphes par néphélométrie

Pour l'étude de la croissance des hyphes dans le milieu liquide par la technique de néphélométrie, nous avons adopté le protocole décrit par Joubert et *al.* (2011). Pour cela, des conidies provenant de cultures âgées de 15 jours sont prélevées. Pour les cultures à forte sporulation, les conidies sont raclées à l'aide d'une pipette pasteur façonnée comme une raclette et pour celles à faible sporulation, elles sont prélevées individuellement ou par bouquets à l'aide

d'une aiguille. Les spores sont ensuite plongées directement dans un microtube de 1,5 ml contenant 1 ml d'eau mQ stérile et 0,1% de tween 20.

A l'aide d'une cellule de Malassez, les suspensions de conidies sont diluées à 10^3 spores/ml. La concentration 10^3 spores/ml est suffisante pour la néphélométrie dans le cas des espèces d'*Alternaria* à grandes conidies. Un volume de 100 μ l de la suspension de conidies est ajouté à 890 μ l d'un milieu liquide PDB (Potato Dextrose Broth) avec 10 μ l de fongicide. Un témoin a été réalisé avec le même volume d'eau distillée stérile. Le volume final est donc de 1000 μ l par traitement. Ce volume total est distribué en 3 répétitions pour chaque traitement. Une microplaque spéciale de 96 puits a été remplie avec des suspensions calibrées de 300 μ l/répétition/puits (Fig.10A).

La croissance des hyphes est automatiquement enregistrée pendant 60 heures à 25°C en utilisant un lecteur néphélométrique (NEPHELOstar Galaxy, BMG Labtech, Offenburg, Allemagne), équipé d'un laser de 635 nm comme source de rayonnement (Fig. 10B et C) Pendant l'incubation, la microplaque est soumise à une agitation à 300 tr/min pendant 5 min et ceci toutes les 10 minutes. Les mesures sont effectuées toutes les heures. Chaque puits est mesuré pendant 0,1 s avec une focalisation du faisceau laser de 2,5 mm.

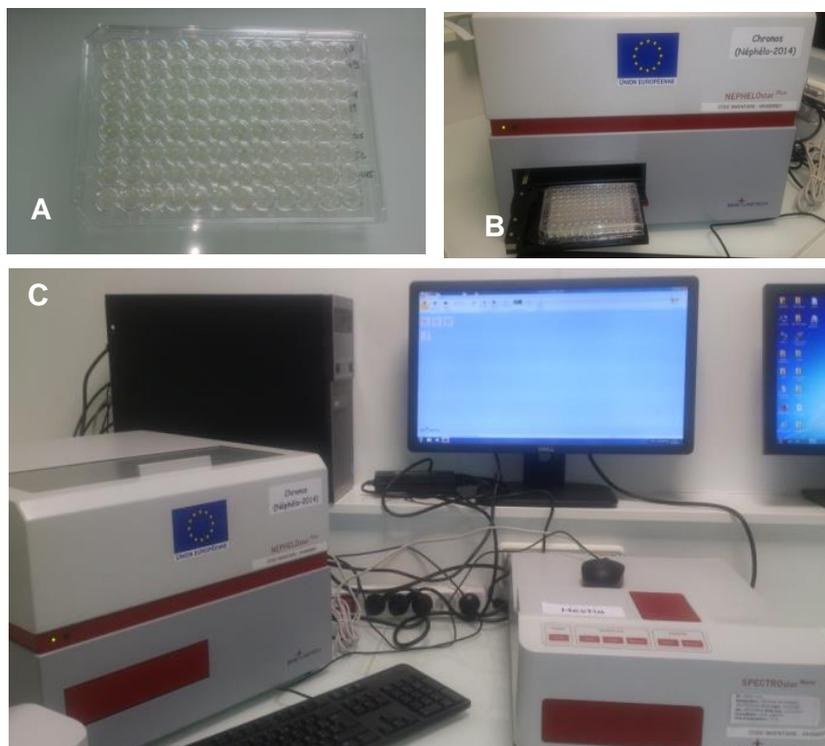


Figure 10 Mesure de la croissance des hyphes par néphélométrie. **A.** Microplaque de 96 puits remplis de suspension (milieu de culture + fongicide + conidies). **B.** Lecteur néphélométrique dans lequel est placée la microplaque. **C.** Exportation et traitement des données.

II.7.5. Analyse des données de croissance

Les données sont traitées par le logiciel Nephelostar Galaxy-format ASCII, puis ultérieurement par Microsoft Excel (Fig. 10C). La phase de latence est définie comme le temps nécessaire pour obtenir une valeur de pente maximale du premier cycle ou la dilatation est linéaire et rapide. Le taux de croissance maximal est défini comme étant la pente la plus élevée.

Les données sont exprimées en unités néphéométriques relatives. L'aire sous la courbe de croissance (AUDCP) et le taux de croissance maximal (MGR) ont été calculés comme indiqué par Joubert et *al* (2011). Les courbes des pourcentages d'inhibition nous ont permis de déterminer les concentrations provoquant la réduction de la croissance des hyphes à 50% (CI50).

RESULTATS & DISCUSSION



III RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Pré-identification des *Alternaria* spp. à grandes conidies

L'isolement réalisé sur les 247 échantillons présentant des symptômes typiques de l'*alternariose* (164 échantillons de pomme de terre et 83 échantillons de tomate) (Tableaux 11, 12 et Annexe 4) obtenus dans douze régions agricoles et répartis selon les quatre zones bioclimatiques algériennes (humide, sub humide, aride et saharienne), a permis d'obtenir 247 échantillons répartis en deux groupes sur la base des caractéristiques culturelles et morphologiques des colonies et conidies. Le premier groupe est représenté par 91 isolats dont toutes les colonies ont une sporulation abondante avec de petites conidies. Le deuxième groupe est représenté par 92 isolats dont les conidies sont caténées large, solitaires à bec typiquement appartenant à la section *Porri* et 64 isolats dont les colonies ne présentent aucune sporulation. Si l'on considère leur répartition par plante-hôte, on constate que la plus grande proportion des colonies sporulantes provient de la pomme de terre (82%) et seulement 10% de la tomate. Par contre, pour les colonies non sporulées, la plus grande proportion provient des tomates (47 %) et seulement 17 % des pommes de terre. Les vérifications effectuées directement sur des échantillons frais pour identifier les types de conidies pour les échantillons non sporulés dans la chambre humide par des observations au stéréomicroscope binoculaire et au microscope ont confirmées la présence du type conidien à large spectre.

Il n'y a pas de relation entre la présence de halo jaune sur les feuilles et la présence de pigment jaune en isolement. Comme il n'y a pas de relation entre la taille de la nécrose (petite, moyenne et grande nécrose) et le type de colonies dans le milieu de culture (sporulantes ou non).

A cause des nombreuses confusions qui ont caractérisé les symptômes d'*alternariose* de la pomme de terre et tomate dans le monde, et vu le peu de travaux réalisés en Algérie sur cette maladie, nous avons voulu à travers la présente étude, apporter des précisions sur les espèces pathogènes responsables présentes en Algérie. Nos prospections réalisées entre 2012 et 2015 ont montré la présence d'espèces d'*Alternaria* à grandes conidies obtenues à partir aussi bien de grandes que de petites taches caractéristiques de l'*alternariose*. Jusqu'aux travaux de Simmons (1995 et 2000) et l'avènement des outils moléculaires que nous discuterons plus loin, deux principales espèces *A. solani* et *A. alternata* étaient rapportées à travers le monde à l'époque des premières descriptions de cette maladie (Ellis et Martin, 1882 ; Galloway, 1891 ; Jones, 1893) en particulier *A. solani* (Waals et *al.*, 2004).

Tableau 11 Résultats des isollements des *Alternaria* spp. à grandes conidies.

Échantillons, type de colonies et conidies, colonies sporulées ou non sporulées	Nombre de pomme de terre et tomate
Total d'échantillons	247
Echantillons de pomme de terre	164
Echantillons de tomate	83
Isolats obtenus avec de petites conidies caténées *	91
Isolats à grandes conidies obtenus à partir de pomme de terre et de tomate	92
- Colonies sporulées de pomme de terre	82
- Colonies sporulées de tomate	10
Colonies de pomme de terre et tomate non sporulée	64
- Colonies de pomme de terre non sporulée	17
- Colonies de tomate non sporulée	47
Isolats à grandes conidies	156
- isolats à grandes conidies issus de pomme de terre	99
- Isolats à grandes conidies issus de tomate	57

Tableau 12 Résultats des pré-identifications des isolats d'isolats d'*Alternaria* spp. à grandes conidies.

1. Isolats à grandes conidies sporulants obtenues à partir de pomme de terre et de tomate	92	Espèces d' <i>Alternaria</i> à grandes conidies				
		<i>A.solani</i>	<i>A. grandis</i>	<i>A. linariae</i>	<i>A. protenta</i>	N.Ident.
- Isolat sporulant obtenu de pomme de terre	83	70	8	4	1	
- Isolat sporulant obtenu de tomate	10	0	0	10	0	
2. Isolat non sporulants obtenus de pomme de terre et tomate	64					
- Isolat non sporulant obtenu de pomme de terre	17	8	1	2	1	5
-						
- Isolat non sporulant obtenu de pomme de terre	47	9	4	29	1	4
3. Identification des isolats à grandes conidies	147					
- Isolats issus de pomme de terre	93	75	9	7	2	
- Isolats issus de tomate	54	18	5	30	1	

III.2. Identification moléculaire des *Alternaria* spp. à grandes conidies

La qualité des extraits d'ADN de l'ensemble des 156 isolats a été vérifiée par le couple d'amorces ITS1/ITS4 (Fig.11). Cela nous a permis donc de passer à l'étape suivante qui est l'amplification de l'ensemble des 156 isolats par des amorces spécifiques pour l'identification des espèces *A. solani*, *A. grandis* et *A. linariae*.

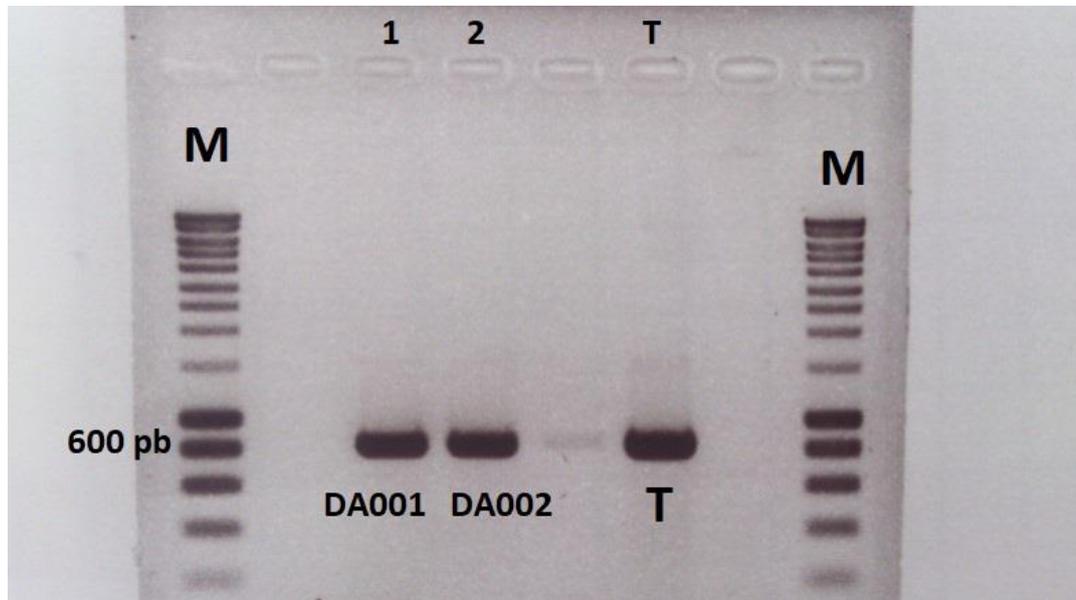


Figure 11 Amplification des isolats d'*Alternaria* spp. avec le couple d'amorce ITS1/ITS4.

(M = Marqueur moléculaire, 1 = Isolat DA001, 2 = Isolat DA002, T= souche de référence d'*Alternaria* spp.)

III.2.1. Identification des espèces d'*Alternaria* à grandes conidies par des amorces spécifiques

Sur la base des caractéristiques culturelles et morphologiques, 156 isolats de grandes conidies (sur un total de 247 isolats) ont été sélectionnés pour la caractérisation moléculaire par PCR en utilisant des amorces spécifiques.

Les extraits d'ADN des 156 isolats ont été amplifiés à l'aide de deux paires d'amorces spécifiques pour différencier *A. linariae* et *A. solani* et les espèces apparentées (*A. grandis* et *A. protenta*) (Gannibal et al., 2014). La paire d'amorces OasF7 et OasR6 a amplifié un fragment de 164 pb du gène Alt a1 de *A. solani*, *A. grandis* et *A. protenta*, et la paire d'amorces OatF4 et OatR2 a amplifié un fragment de 438 pb du gène codant la calmoduline des *A. linariae*.

Les figures 12 et 13 montrent les résultats des PCR spécifiques et la détection des espèces respectivement *A.Solani/A.grandis* et *A.linariae*. Ces espèces ont déjà été signalées en Algérie par Bessadat (2016) et dans le monde par Gannibal et *al* (2013), Rodriguez et *al* (2010), Landschoot et *al* (2017).

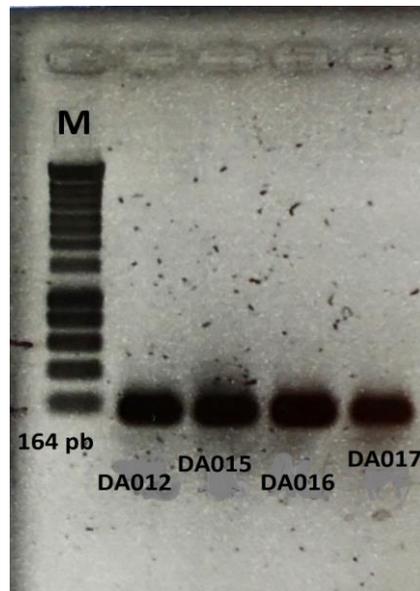


Figure 12 PCR spécifique d'identification d'*A.solani et A. grandis*.

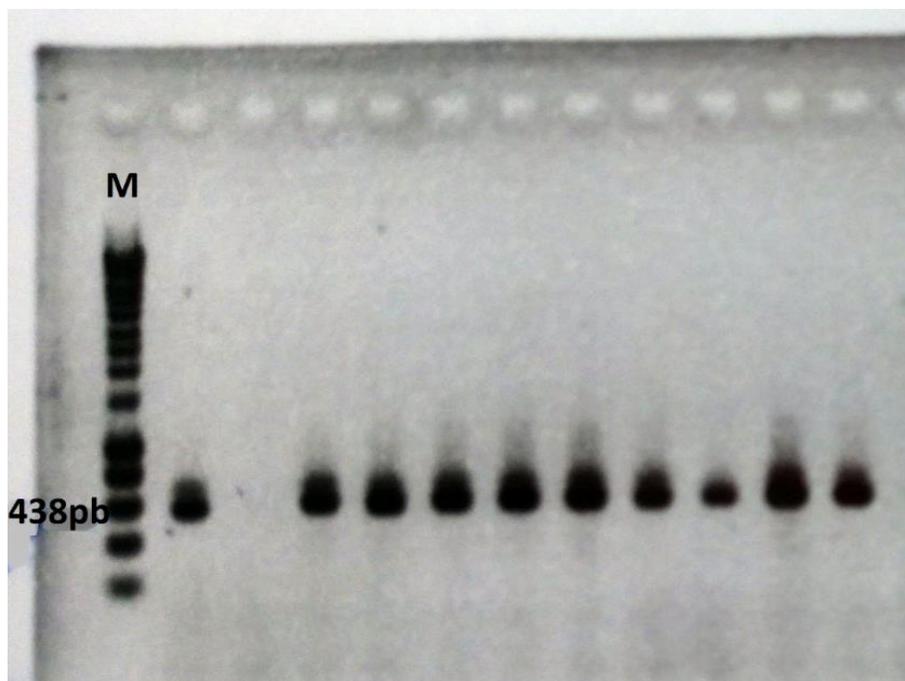


Figure 13 PCR spécifique d'identification d'*A.linariae*.

III.2.2. Différenciation d'*A. solani* et *A. grandis* par PCR/ RFLP

D'autres identifications d'espèces ont été menées afin de différencier les isolats d'*A. solani* et d'*A. grandis* d'une part, et de confirmer l'identification d'*A. linariae* d'autre part.

Les conditions de PCR sont celles décrites par Gannibal et *al* (2014). Différencier entre *A. grandis* et *A. solani* sensu lato (c'est-à-dire incluant *A. protenta*), une partie du gène de la calmoduline a été amplifiée à partir des isolats qui ont chacun donné un signal positif avec la paire d'amorces OasF7 - OasR6 utilisant la paire CALDF1 / CALDR1 (Lawrence et *al.*, 2013). Les produits PCR obtenus ont été doublement digérés avec les enzymes de restriction *RsaI* et *HaeII*. Les produits de digestion ont ensuite été séparés par électrophorèse dans des gels d'agarose à 2% et visualisés sous lumière UV après coloration au bromure d'éthidium.

Les modèles de restriction prévus différaient principalement en fonction de la taille du plus gros fragment, c'est-à-dire 420 pb pour *A. solani* sensu lato et 292 pb pour *A. grandis* (Fig. 14).

L'identification des espèces d'*Alternaria* a été validée en séquençant le fragment du locus calmoduline amplifié comme décrit ci-dessus à partir de 43 isolats.

La PCR/RFLP par amplification du locus Calmodulin suivie d'une double digestion enzymatique de restriction (*HaeII* et *RsaI*) des produits PCR a permis d'identifier 43 isolats de *A. linariae*, 92 isolats de *A. solani*, 12 isolats de *A. grandis* et 6 isolats qui ont montré une digestion enzymatique anormale de restriction (Fig.15).

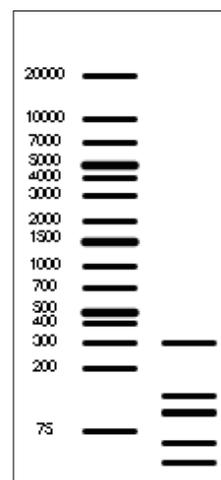
III.2.3. Identification des espèces *Alternaria* à grandes conidies par séquençage

Pour confirmer la présence d'*A. protenta*, une partie du locus RPB2 a été amplifiée à partir des isolats identifiés comme étant *A. solani* sur la base de leur séquence de calmoduline, en utilisant la paire d'amorces RPB2-5F2 (Sung et *al.*, 2007) et RPB2-7cR (Liu et *al.*, 1995) et le produit PCR résultant a été séquençé. Le séquençage de Sanger a été effectué par GATC Biotech en Allemagne. Des analyses séquentielles ont été effectuées à l'aide de l'outil service web Phylogeny.fr (Dereeper et *al.*, 2008). De multiples alignements de séquences ont été générés avec MUSCLE et conservés à l'aide de l'algorithme Gblocks. Des analyses du maximum de vraisemblance (LM) ont été effectuées avec PhyML. La robustesse des topologies ML a été évaluée à l'aide de la méthode Test de Shimodaira-Hasegawa (SH) pour les branches.

Analyse de restriction de CAL *grandis* suite à la double digestion
HaeII + *RsaI*

Génération de 06 fragments comme suit :

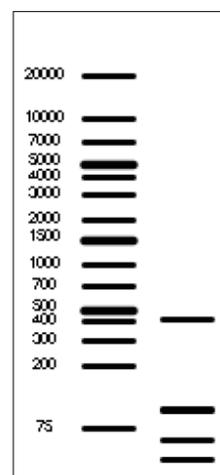
1:	292 bp	- de	RsaI[435]	à	---
2:	128 bp	- de	RsaI[307]	à	RsaI[435]
3:	102 bp	- de	HaeII[205]	à	RsaI[307]
4:	99 bp	- de	---	à	RsaI[99]
5:	61 bp	- de	HaeII[144]	à	HaeII[205]
6:	45 bp	- de	RsaI[99]	à	HaeII[144]



Analyse de restriction de CAL *solani* avec la double digestion
HaeII + *RsaI*

Génération de 05 fragments comme suit :

1:	420 bp	- de	RsaI[307]	à	---
2:	102 bp	- de	HaeII[205]	à	RsaI[307]
3:	99 bp	- de	---	à	RsaI[99]
4:	61 bp	- de	HaeII[144]	à	HaeII[205]
5:	45 bp	- de	RsaI[99]	à	HaeII[144]



Analyse de restriction de CAL *linariae* avec la double digestion de
HaeII + *RsaI*

Génération de 04 fragments comme suit :

1:	420 bp	- de	RsaI[307]	à	---
2:	163 bp	- de	HaeII[144]	à	RsaI[307]
3:	99 bp	- de	---	à	RsaI[99]
4:	45 bp	- de	RsaI[99]	à	HaeII[144]

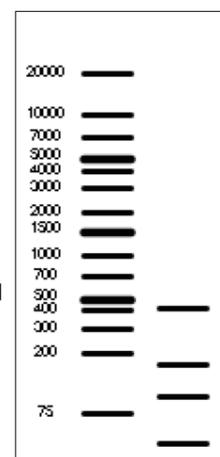


Figure 14 Schema des profils d'*Alternaria* spp. Sur le logiciel Serial Cloner 2-5, après la digestion du produit d'amplification CALD par les enzymes de restriction *Hae II* + *RsaI* ((**A** : Profil d'*A.grandis*, **B** : Profil d'*A.solani*, **C** : Profil d'*A.linariae*)).

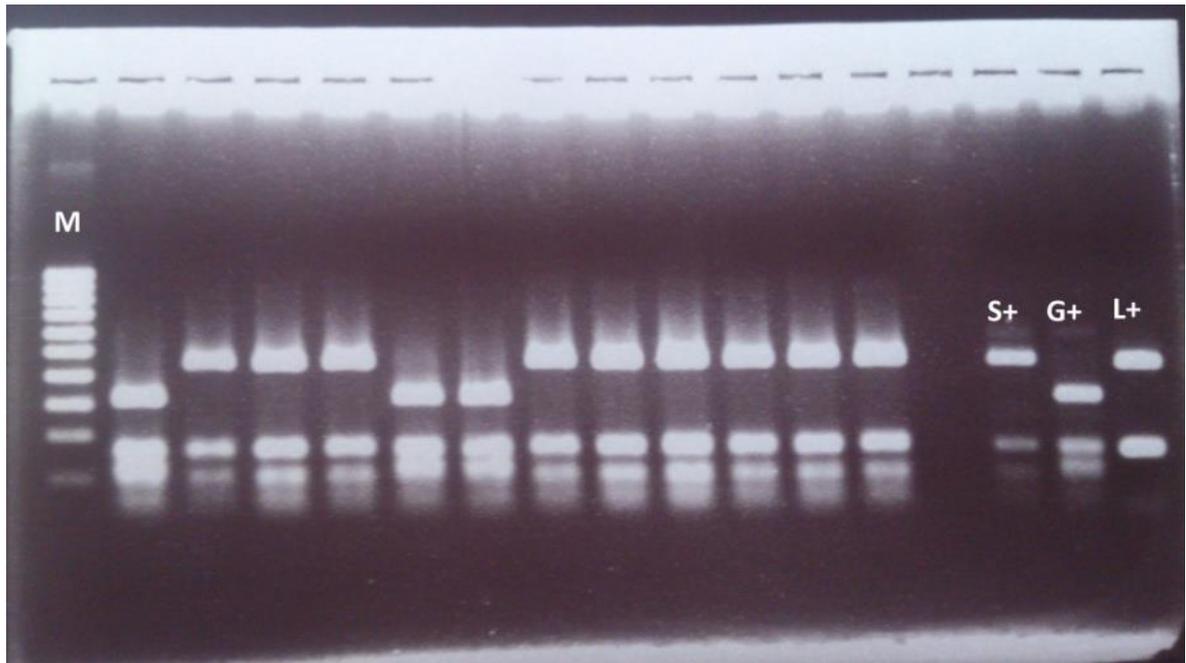


Figure 15 Profil de PCR/RFLP et la double digestion enzymatique avec la position des trois espèces : *A. solani* (S+), *A. grandis* (G+) et *A. linariae* (L+)

Le séquençage de 42 isolats représentant chacune des quatre espèces identifiées précédemment et isolées à partir des deux plantes hôtes prélevées dans les 12 régions étudiées a donné l'arbre phylogénétique représenté sur la figure 16. Le premier groupe (A) contient les isolats d'*A. linariae* qui sont très distincts des deux autres sous-groupes (B1 et B2) regroupant des isolats précédemment identifiés par une amorce spécifique comme *A. solani*. Le groupe B1 comprend les isolats d'*A. solani* et le groupe B2 regroupe les isolats d'*A. grandis*. Enfin, le séquençage du locus Rpb2 effectué sur le second groupe comprenant des isolats d'*A. solani* a permis d'identifier 3 isolats d'*A. protenta* dont 2 isolés sur pomme de terre et 1 isolé sur tomate (Fig.17).

Pendant longtemps l'identification des espèces était menée par une caractérisation morphologique ; les approches phylogénétiques combinant plusieurs multilocus ou (Identification des espèces communément associées aux *Solanaceae* sur la base de l'analyse moléculaire). (Mais ce n'est pas une tâche facile à accomplir par des non-spécialistes : Cardoso, 2014). Egalement *A. linariae* traditionnellement considéré comme inféodé au seul hôte la tomate est récemment signalée dans une région particulière du Brésil (Cardoso, 2014), est retrouvé également en Algérie infectant naturellement cette même culture, notamment dans des régions où cohabitent les deux plantes pomme de terre et tomate par succession au cours des saisons, dans les régions côtières de

la région d'Alger et de l'Oranie. Autrement avec le temps, *A. linariae* s'est adapté sur la pomme de terre selon un processus physiopathologique tel que discuté par Phytopathology mais qui reste à élucider dans notre cas ! Il reste la question de l'*A. protenta* que nous signalons pour la première fois sur pomme de terre (Ayad et *al.*, 2017) dans une région particulière caractérisée par un climat saharien de fortes chaleurs avec une conduite de la culture sous irrigation par aspersion.

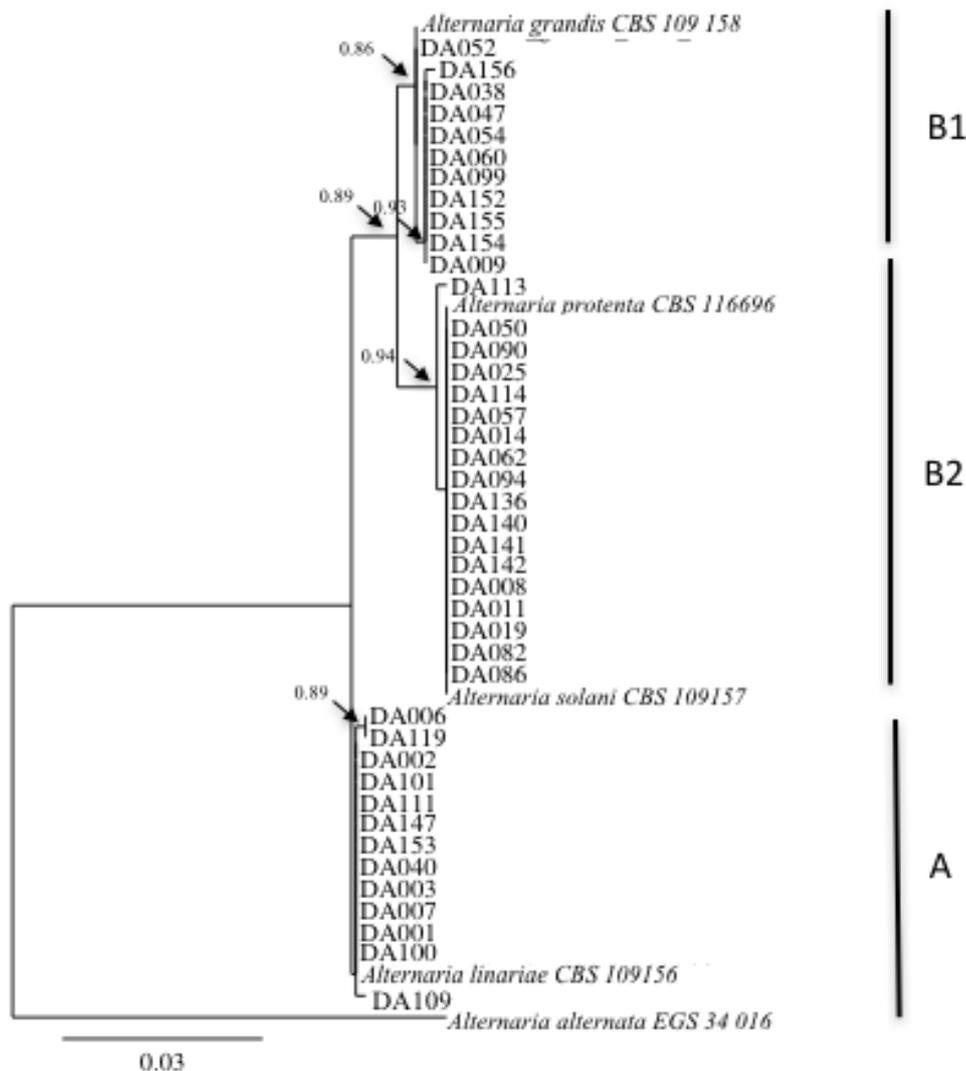


Figure 16 Arbre phylogénétique reconstruit à partir de l'alignement de séquences de calmoduline de 42 isolats appartenant à la section *Alternaria Porri*. Les valeurs de support Bootstrap supérieures à 80 % sont indiquées par des flèches. Les séquences de calmoduline des souches suivantes ont été incluses comme références : *A. linariae* CBS 109156 (GenBank numéro JQ646257), *A. protenta* CBS 116696 (GenBank numéro JQ646236), *A. solani* CBS 109157 (GenBank numéro KJ397981), *A. grandis* CBS 109158 (GenBank numéro JQ646249). La séquence de calmoduline d'*A. alternata* EGS 34016 (Genbank numéro JQ646208) a été utilisée pour enraciner l'arbre.

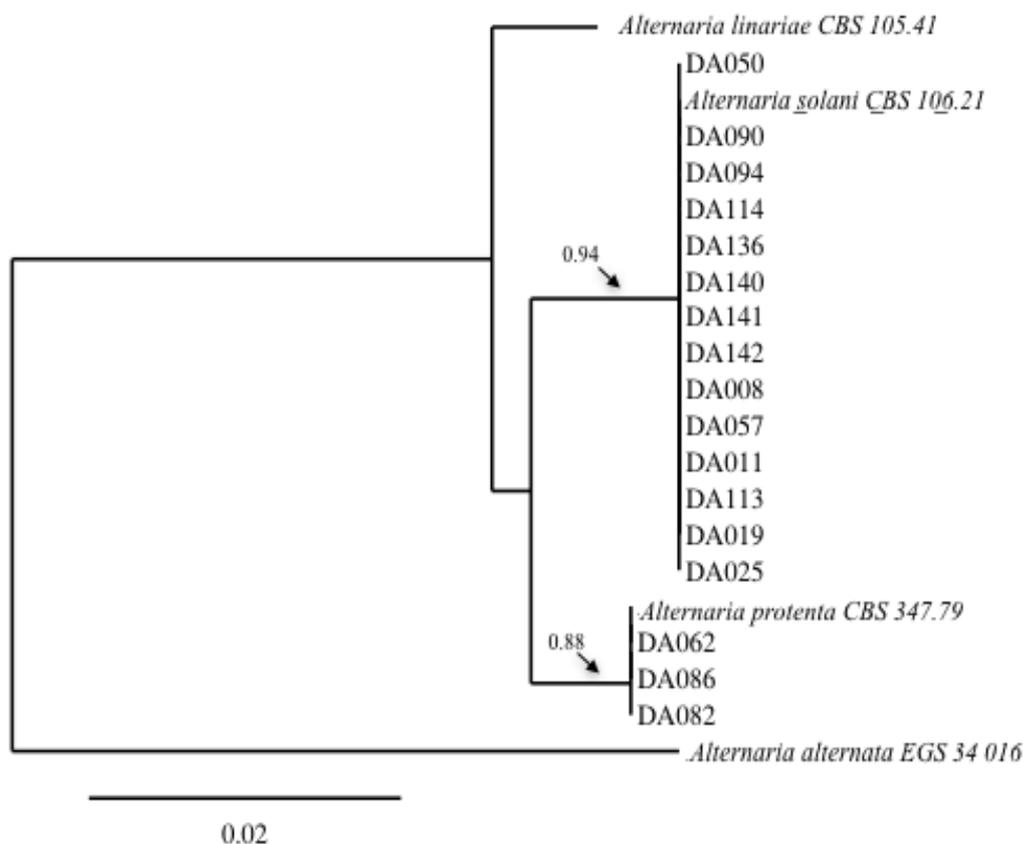


Figure 17 Arbre phylogénétique reconstruit à partir de l'alignement de séquences RPB2 de 17 isolats appartenant au groupe B2 dans la phylogénie de la calmoduline. Les valeurs de support Bootstrap supérieures à 80 % sont indiquées par des flèches. Les séquences RPB2 des souches suivantes ont été incluses comme références : *A. linariae* CBS 105.41 (GenBank numéro KJ718353), *A. solani* CBS 106.21 (GenBank numéro KJ718410) *A. protenta* CBS 347.79 (GenBank numéro KJ718392). La séquence RPB2 de *A. alternata* EGS 34016 (Genbank numéro JQ646490) a été utilisée pour enraciner l'arbre.

Cette espèce a été retrouvée et pour la première fois sur un autre hôte la tomate, dans une région bioclimatique totalement différente à celle du Sud à savoir dans la région côtière de l'Oranie à l'Ouest du pays.

III.3. Caractérisation phénotypique des *Alternaria* spp.

Les deux types d'espèces d'*Alternaria* pathogènes et saprophytes ont été isolées des deux cultures de pomme de terre et tomate à travers les 12 régions prospectées des wilayas le nord Alger, Tipaza, Bouira, Gulema, Skikda, Ain Defla, Chlef, Mascara, Mostaghanem, Laghouat, Biskra et El Oued.

Une collection initiale de 247 isolats dont 156 représente les espèces pathogènes à grandes conidies qui rentrent dans l'intérêt de notre étude. Les 247 isolats ont été purifiés par des cultures monoconidies et conservés dans la mycothèque du laboratoire de microbiologie de l'équipe Fungisem à l'IRHS d'Angers en France. A partir de la collection de 156 d'isolats d'espèces pathogènes à grande conidies, une sous collection de 42 isolats représentant les deux cultures de pomme de terre et tomate provenant des deux systèmes de production (sous serre et en plein champs) à travers les différentes zones agro-écologiques selon les étages bioclimatiques du pays. Cette collection de 42 isolats est soumise à l'étude moléculaire et phénotypique dont les résultats de notre étude.

III.3.1. Caractérisation culturelle

La caractérisation morpho-culturelle a été initié par la caractérisation culturelle des 42 isolats étudiés qui ne nous a pas permis de distinguer les différents morphotypes. Malgré la grande variabilité constatée entre les 42 isolats de par leur type de culture, la couleur et l'aspect du mycélium ainsi que la forme des colonies sans oublier leurs pigmentations, le caractère cultural reste incapable de séparer entre les espèces d'*Alternaria* spp. L'ensembles des caractères cultureux est résumé dans le tableau 13.

Les résultats des cultures des 42 isolats d'*Alternaria* spp sur le milieu PDA ont révélés une variation considérable dans leurs caractères cultureux. Le type de culture varie entre l'homogénéité de la surface qui est lisse avec l'observation parfois des cercles concentriques bien dessinés, circulaires et l'hétérogénéité exprimée par une surface rugueuse et parfois ridées ou même si les cercles concentriques sont dessinés mais sont légèrement à totalement irréguliers selon la rugosité de la surface des cultures. Les figures 18, 19, 20 et 21 représentent l'aspect cultural des 04 espèces identifiées.

Tableau 13 Caractères cultureux des 42 isolats d'*Alternaria* spp.

Espèce	Code	Type de culture	Couleur de la culture	Aspect du mycélium	Forme de la colonie	Pigmentation
<i>A.linariae</i>	DA001	LSZ	VO	SGC	I	OR
	DA002	LSZ	G	AC	C	R
	DA003	LSZ	G	AC	I	R
	DA006	RAZ	G	SGC	I	R
	DA007	RSZ	DG	BCO	I	RF
	DA040	RAZ	DG	AC	C	BR
	DA100	RSZ	G	DR	I	P
	DA101	LAZ	VB	SGC	C	P
	DA109	LSZ	G	AC	LI	OJ
	DA111	RAZ	GF	AC	LI	P
	DA119	LSZ	DG	SGC	C	SP
	DA147	RAZ	DG	AC	LI	MJ
	DA153	RAZ	VB	AC	C	RF
<i>A.grandis</i>	DA009	RSZ	VO	AC	C	OR
	DA038	RAZ	DVO	BCO	C	R
	DA047	LAZ	VB	SGC	LI	P
	DA052	LAZ	DVO	BCO	C	RF
	DA054	RSZ	DM	AC	I	SP
	DA060	RSZ	VB	AC	LI	BR
	DA099	RAZ	DVO	SGC	C	RF
	DA152	LAZ	DVO	AC	C	SP
	DA154	RSZ	DG	BCO	I	OR
	DA155	LAZ	DM	AC	C	SP
	DA156	LAZ	DG	BCO	LI	RF
<i>A.solani</i>	DA008	LAZ	VB	DR	C	SP
	DA011	LAZ	VO	DR	C	SP
	DA014	LAZ	DVO	BCO	C	OR
	DA019	LAZ	VB	SGC	C	SP
	DA025	LAZ	DVO	SGC	C	RF
	DA050	LAZ	DM	SGC	C	SP
	DA057	RAZ	DG	DR	C	P
	DA090	RAZ	G	AC	LI	P
	DA094	LAZ	DVO	BCO	C	OJ
	DA113	LSZ	G	BCO	C	OR
	DA114	RAZ	DVO	AC	C	R
	DA136	LAZ	DVO	AC	C	SP
	DA140	RSZ	DG	AC	C	OR
	DA141	LSZ	G	DR	C	MJ
DA145	LSZ	G	DR	C	BR	
<i>A.protenta</i>	DA062	RSZ	G	BCO	LI	RF
	DA082	RAZ	DM	SGC	C	SP
	DA086	LAZ	VB	DR	C	P

Type de culture : LAZ : lisse avec zone concentrique, LSZ : lisse sans zone concentrique, RAZ : rugueuse avec zone concentrique
RSZ : rugueuse sans zone concentrique

Couleur de la culture : VO : vert olivâtre, G : gris, DG : dégradé de gris au centre et clair en périphérie, DM: dégradé de marron e
blanc en périphérie, VB : vert bouteille, GF : gris foncé, DVO : dégradé de vert olivâtre

Aspect du mycélium : DR : duveteux ras, AC : aérien cotonneux, SGC : sub-aérien gris clair, BCO : bouquet en cristaux oranges
ADG : aérien dense gris.

Forme de la colonie et bordure : C: circulaire, I : irrégulière, LI : légèrement irrégulière

Pigmentation : OJ : orange jaunâtre, OR : orange rougeâtre, MJ : marron jaunâtre, P : pêche, O : orange, BR : beige rosâtre, R
Rouge, RF: rouge foncé, SP : sans pigment

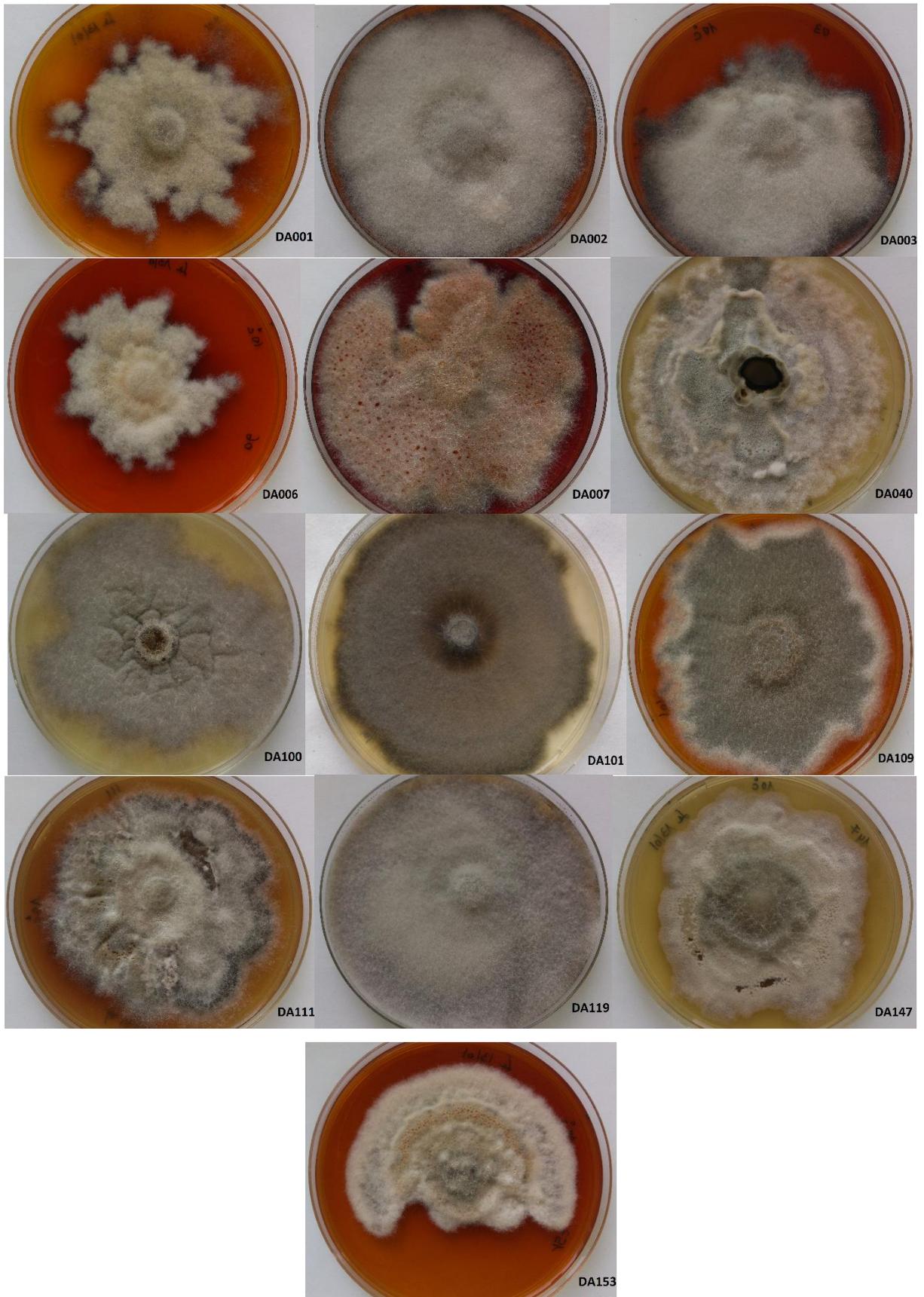


Figure 18 Aspect cultural des 13 isolats d'*A.linariae*.

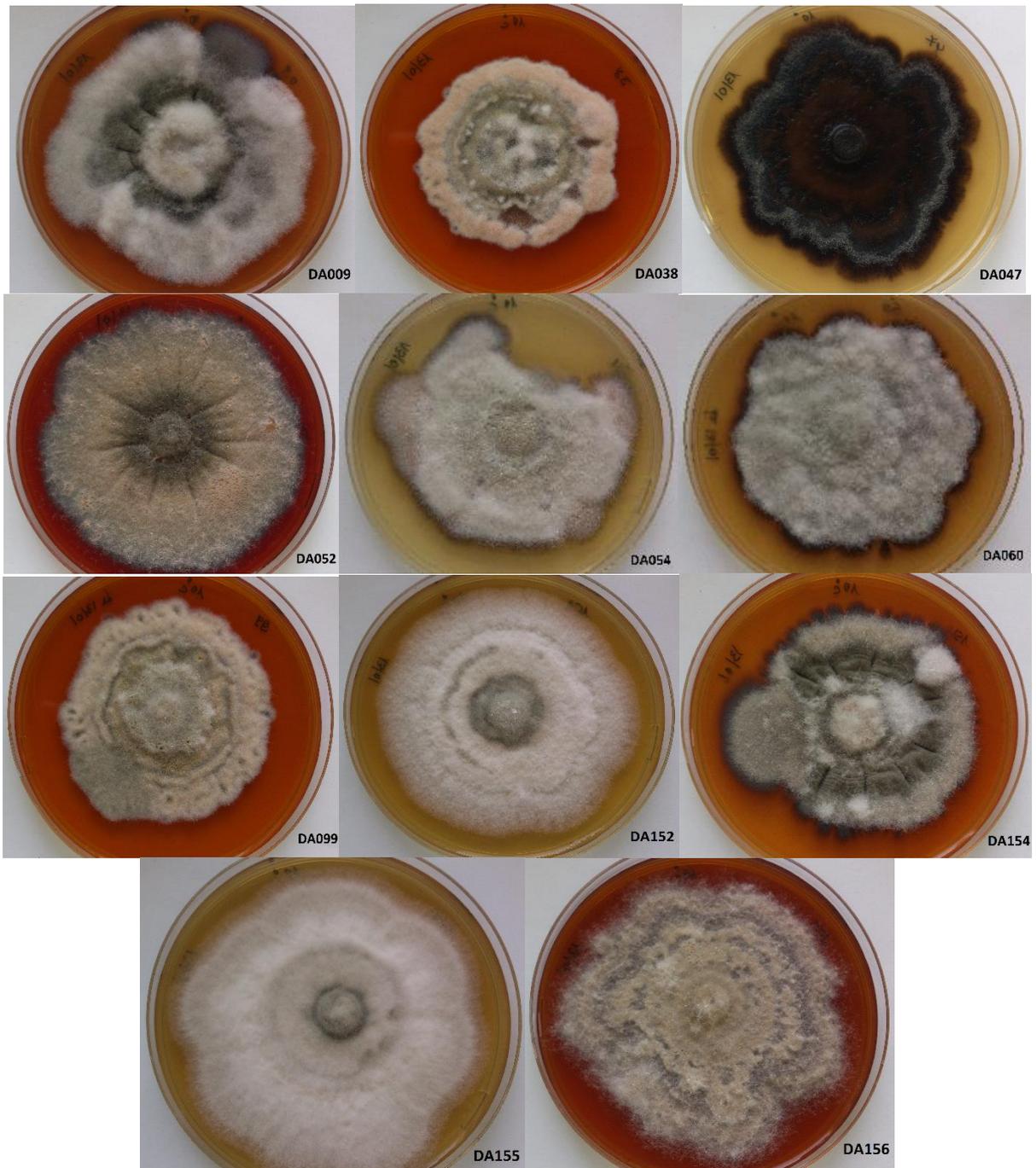


Figure 19 Aspect cultural des 11 isolats d'*A. grandis*.

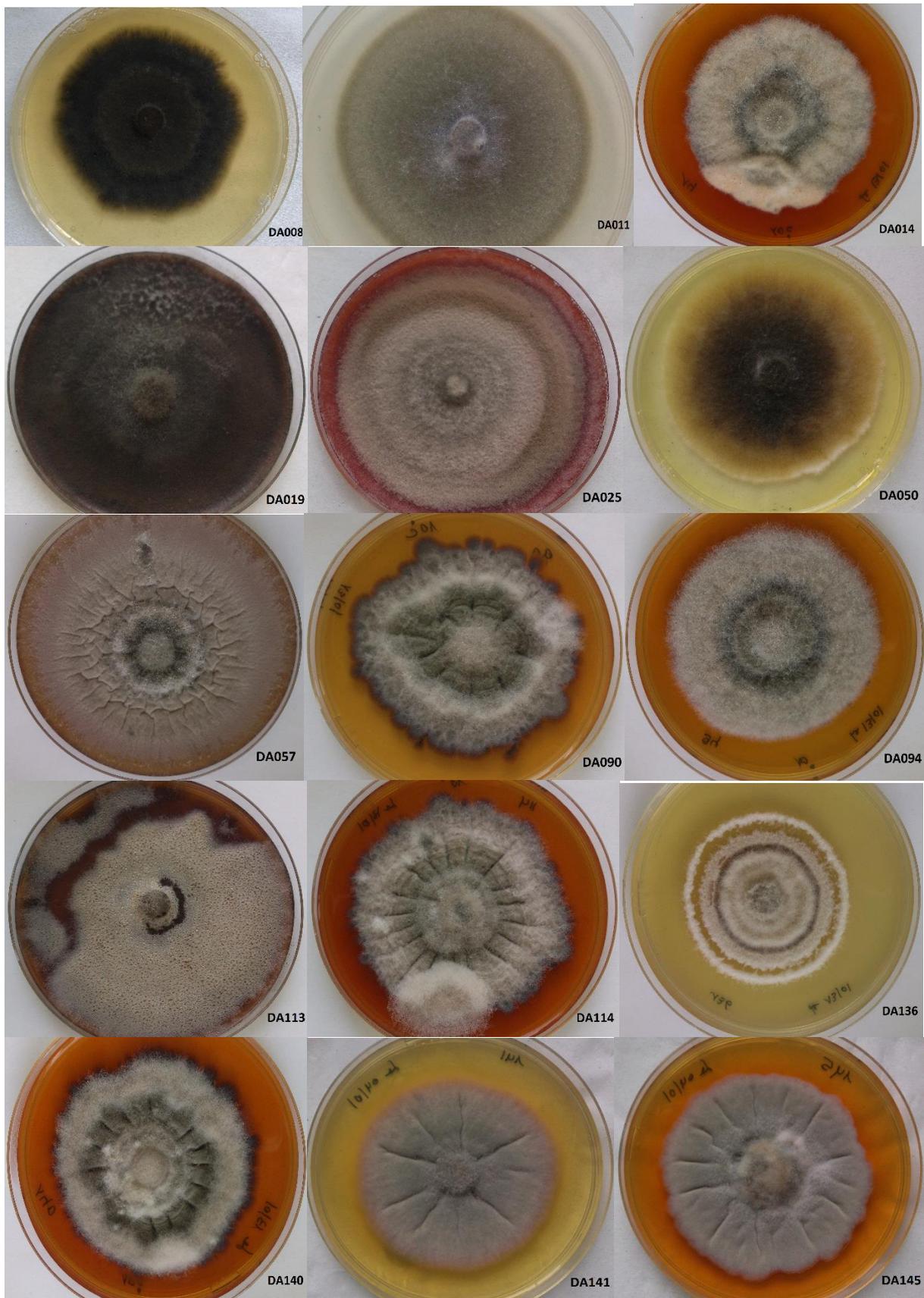


Figure 20 Aspect cultural des 15 isolats d'*A. solani*.



Figure 21 Aspect cultural des 03 isolats d'*A. protenta*.

Le caractère cultural est donc de loin celui à considérer pour séparer entre les espèces, car on constate que même au sein d'une même espèce, la variabilité culturelle est fort présente. On constate que pour l'ensemble des espèces, la couleur des colonies balance entre le vert olivâtre ou vert bouteille, gris ou parfois marron. La majorité des colonies présentent un dégradé de vert olivâtre vers vert bouteille ou un dégradé de gris et parfois un dégradé de marron. La forme de la colonie est exprimée généralement par sa bordure surtout lors de l'absence des zones concentriques qui fait qu'elle varie de légèrement irrégulière à irrégulière. La bordure peut être aussi bien circulaire surtout avec la présence des cercles concentriques bien dessinés sur une surface des colonies lisse et homogène. L'aspect du mycélium est soit dense et cotonneux qui couvre la surface aérienne de la colonie soit duveteux et ras. Lors de la présence d'une pigmentation qui prend les couleurs chaudes autour du jaune à orange jusqu'au magenta, le mycélium présente un aspect de brillance sous forme de cristaux. D'après Simmons (2000), seul le mode de sporulation, la taille des pores et le nombre de becs peuvent séparer les espèces à grandes conidies d'*Alternaria* spp.

III.3.2. Caractérisation morphologique

La caractérisation morphologique est effectuée sur 28 isolats qui ont sporulé d '*Alternaria* spp de grandes spores isolés des quatre coins du pays dont 03 *A. linariae* (DA002, DA007 et DA153), 10 *A. grandis* (DA009, DA038, DA047, DA052, DA060, DA099, DA152, DA154, DA155, DA156), 12 *A.solani* (DA008, DA014, DA019, DA025, DA057, DA090, DA094, DA113, DA114, DA140, DA141, DA145), 03 *A.protenta* (DA062, DA082, DA086). Les résultats de la caractérisation morphologique nous indiquent le type de spores des 28 isolats, singulières ou en groupes, leur forme, muriforme ou ellipsoïdale effilée avec bec et parfois ramifiés ainsi que leur taille qu'on retrouve dans le tableau 14. Les résultats sur les mensurations des spores des 04 espèces sont récapitulés dans le tableau 15 et la figure 22.

Nous constatons une différence dans la forme des conidies des 04 espèces d'*Alternaria* spp. étudiées qui est plus ou moins fines, longues et solitaires à transepta et longisepta ainsi que dans la morphologie de leur bec. Cet appendice hyalin diffère d'une espèce à l'autre par sa taille et le nombre de ses ramifications qui varie de 1 à 4. Cependant, la taille des conidies ainsi que celle de leur bec se présentent en une large gamme. La technique de mensuration des pores d'*Alternaria* spp est selon celle utilisée par Orina et *al.* (2011) (fig. 23).

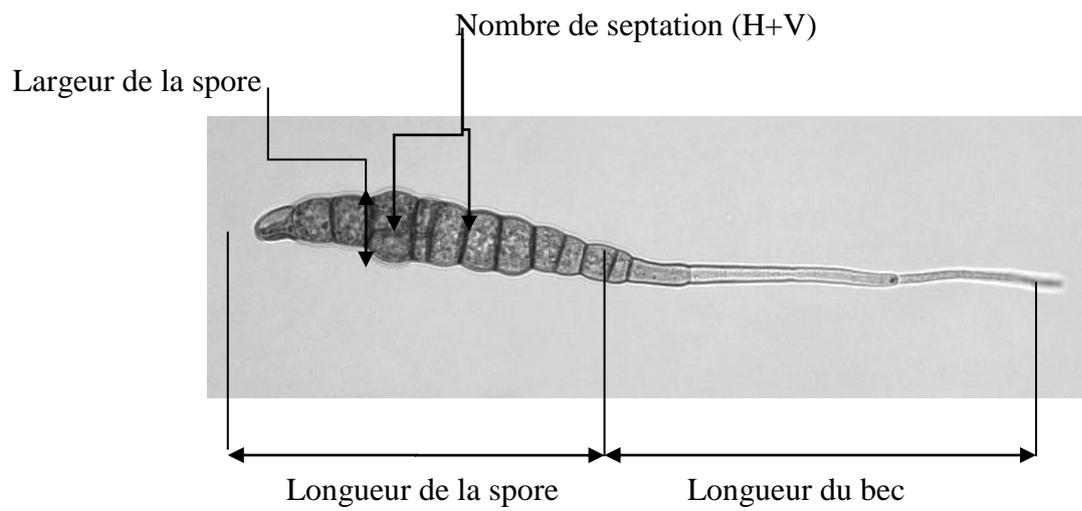


Figure 23 : Schéma de mensuration des conidies d'*Alternaria* spp (Orina et al., 2011).

Les figures 24, 25 et 26 représentent les mensurations des conidies, nous ont permis de constater 03 morphotypes bien distincts.

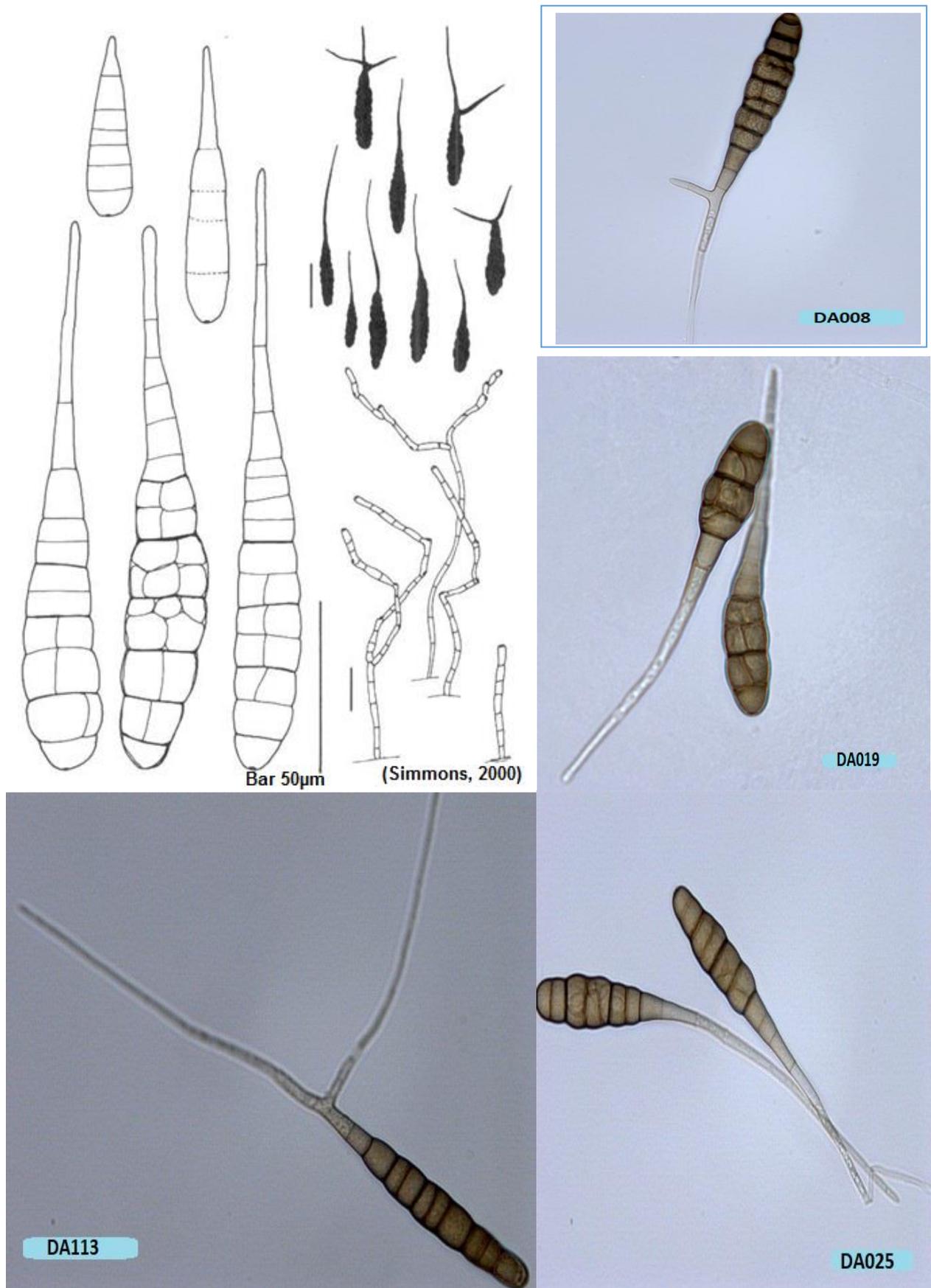


Figure 24 Morphotype 1 représentant les conidies d'*A. solani* selon la description de Simmons (2000).

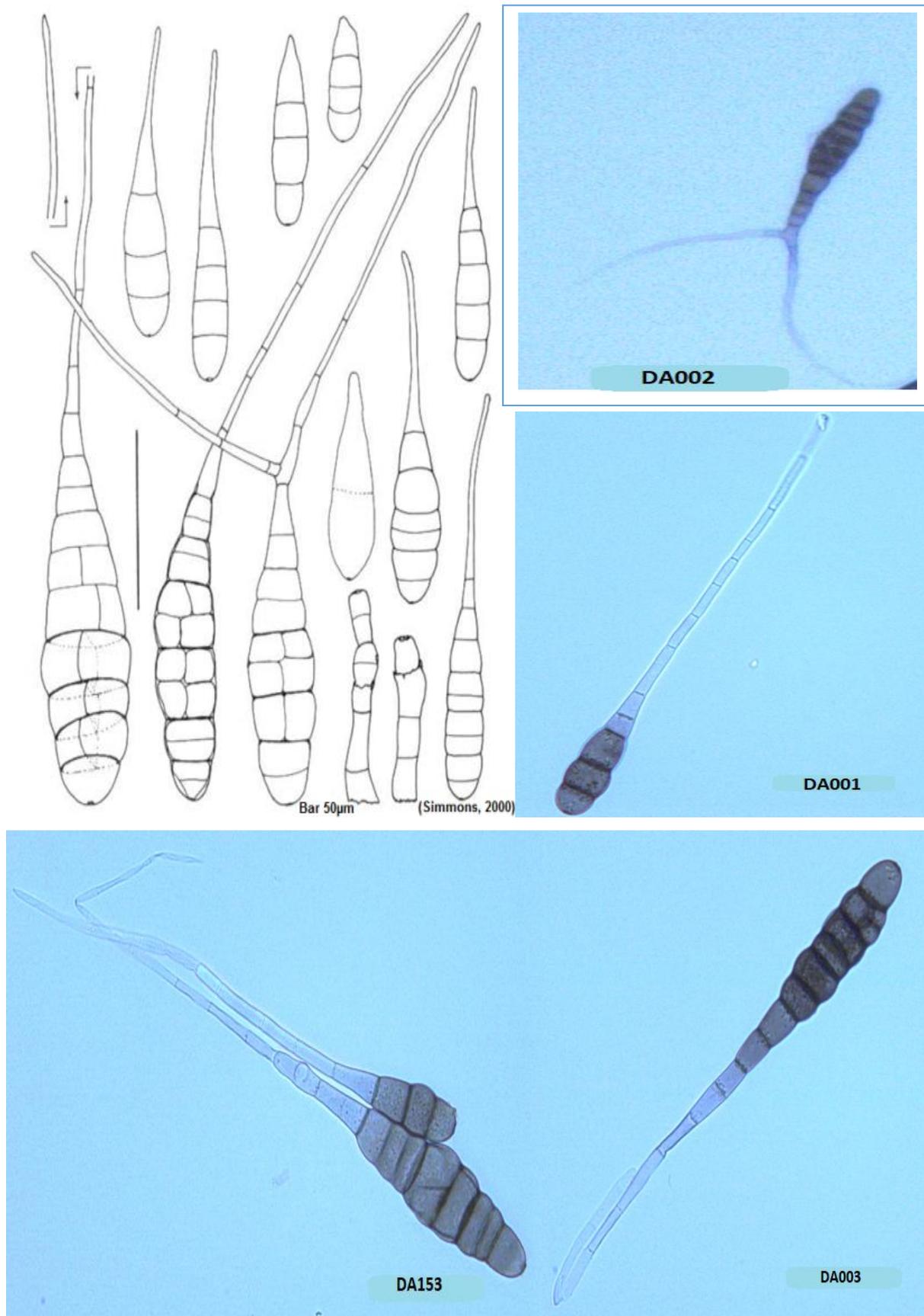


Figure 25 Morphotype 2 représentant les conidies d'*A.linariae* (syn.*A.tomatophila*) selon la description de Simmons (2000).

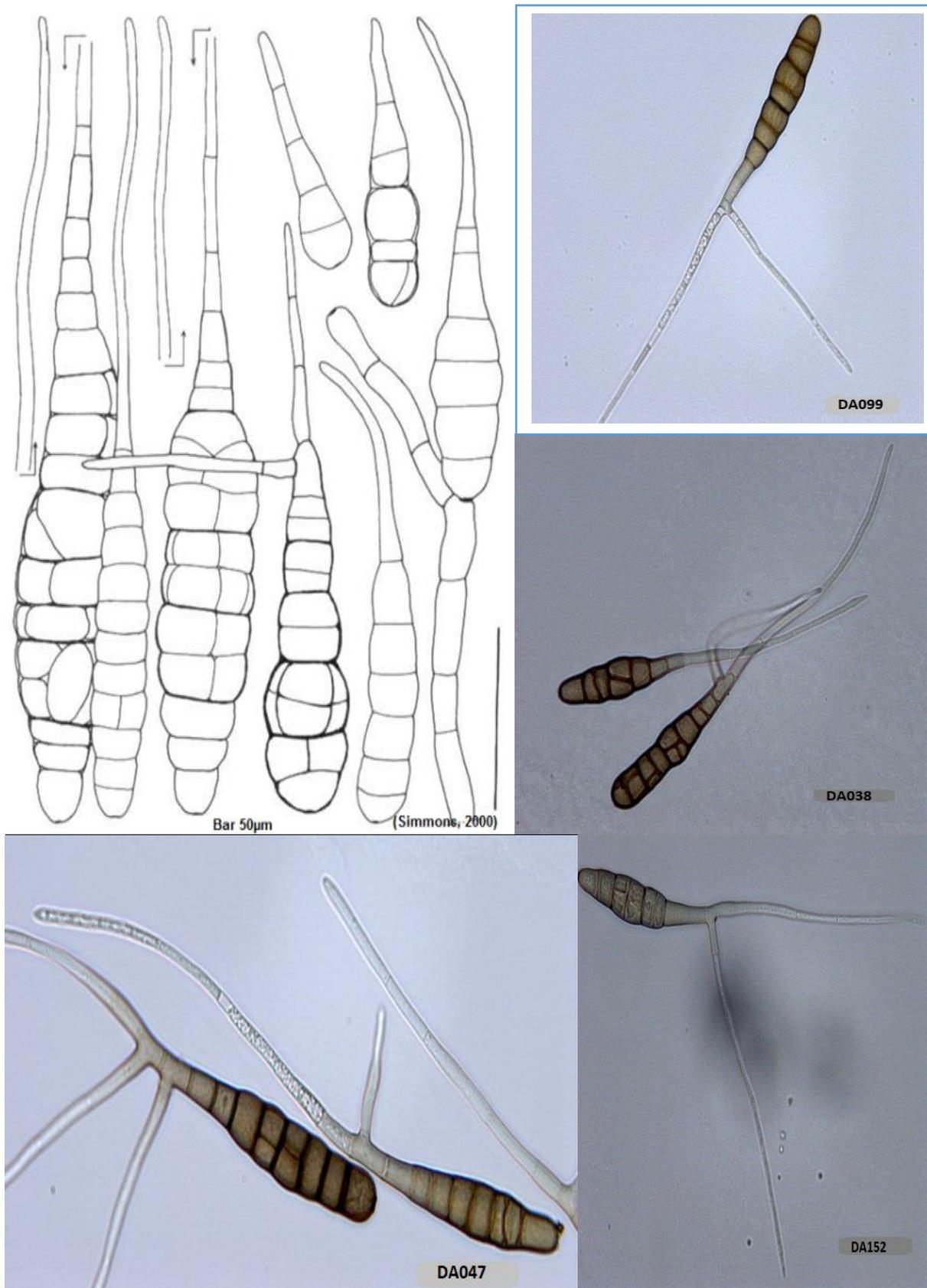


Figure 26 Morphotype 3 représentant les conidies d'*A. grandis* selon la description de Simmons (2000).

Nous constatons que les conidies des *Alternaria* spp sont soit individuelles ou en courtes chaînes de 02 conidies au maximum, elles sont généralement droites ou légèrement flexueuses, leur couleur varie du brun clair à foncé quant à leur dimension, c'est selon le morphotype. Pour le morphotype 1 représentant l'espèce *A. solani*, la longueur de leurs conidies varie de 49,46 à 200,62 µm, leur largeur de 16,11 à 48,74 µm avec des longueurs de leur bec de 17,15 à 197,91 µm. Pour *A. protenta*, la longueur de leurs conidies varie de 53,49 à 171,86 µm, leur largeur varie de 16,80 à 44,28 µm et la longueur de leur bec varie de 57,90 à 267,89 µm avec 1 à 8 transepta et 1 à 10 longisepta. Cette dernière espèce est très proche d'*A. solani* d'après les mensurations de ses conidies.

Pour le morphotype 2 *A. linariae*, la différence est claire avec *A. solani* par la longueur de leur spore qui varie de 77,77 à 80,11 µm, leur largeur de 13,08 à 20,69 µm et la longueur de leur bec de 125,74 à 151,80 µm portant 2 à 11 transepta et 0 à 3 longi-septa. D'après Orina et al. (2011), les caractéristiques morphologiques sont suffisantes pour distinguer entre *A. solani* et *A. linariae*.

La longueur des conidies du morphotype 3 représentant *A. grandis* varie de 52,62 à 399,05 µm, leur largeur varie de 17,40 à 64,42 µm et la longueur de leur bec varie de 80,82 à 407,03 µm avec 2 à 19 transepta et 0 à 7 longisepta.

Nos résultats sont en accord avec les mensurations rapportées par Simmons (2007) sur les 03 morphotypes, *A. solani*, *A. linariae* et *A. grandis* dans le sens où *A. linariae* possède des conidies plus fines avec un bec plus long que *A. solani* alors que *A. grandis* est l'espèce dont le corps de la spore est plus grand par rapport aux deux premières espèces par la longueur de ses conidies et celle de son bec qui sont plus importantes.

En effet, en raison de la variabilité des dimensions des conidies des *Alternaria* spp, plusieurs auteurs ont rapportés que les dimensions des conidies d'*A. solani*, se chevauchant avec des dimensions d'autres espèces à grandes conidies que les conidies sont généralement de couleur pâle à brun-olivâtre, produites individuellement ou rarement en chaînes courtes, droites ou légèrement flexueuses, à double paroi avec 0-8 cloisons longitudinale ou transversale oblique avec 75-350 µm de longueur et 6-19 µm de largeur ou de 20-30 µm dans la partie la plus large (Ellis & Martin 1882; Rao 1964, 1969). Les Becs sont d'environ un demi à un tiers de la longueur de la conidie, filiforme, droit de flexueux, cloisonnées, hyalines à brun pâle et 5-9 µm de diamètre (Ellis & Martin 1882 ; Rao 1964, 1969).

Pour les conidiophores, nous avons noté leur couleur de brun à olivâtre qui ont parfois des parois épaisses, et dont leur largeur varie de 2.80 μm à 10.48 μm . Neergaard (1945) et Ellis & Gibson (1975) ont rapporté que les conidiophores sont foncé ou brun olivâtre, à paroi épaisse, droits à flexueux, cloisonnées, surviennent seuls ou en petits groupes, jusqu'à 110 μm de longueur et 6-10 μm de diamètre.

Les caractéristiques morphologiques des conidies et conidiophores sont les principaux critères taxonomiques traditionnels pour l'identification des espèces fongiques mais qui peuvent être fortement influencé par les facteurs environnementaux. Ainsi, le mode de sporulation reste le seul critère morphologique qui est utilisé pour la discrimination des espèces de grandes conidies (Lawrence et *al.*, 2013).

Dans ce présent travail, l'identification assisté par des symptômes foliaires, la gamme d'hôtes et des caractéristiques culturelles reste insuffisante et nécessite l'intervention des techniques moléculaires pour mieux vérifier l'identité des espèces.

Tableau 14 Caractères morphologiques des 04 espèces identifiées d'*Alternaria* spp.

Caractères Morphologiques	<i>A.solani</i>	<i>A.grandis</i>	<i>A.linariae</i>	<i>A.protenta</i>
Largeur de l'hyphe	4.23 – 7.75 μm	4.40 – 8.74 μm	3.39 – 8.37 μm	3.40 – 6.67 μm
Longueur de la conidie	76.23 – 80.86 μm	36.17 – 97.15 μm	41.08 – 108.27 μm	28.14 – 93.90 μm
Largeur de la conidie	13.47 – 25.54 μm	10.66 – 21.70 μm	8.47 – 17.12 μm	10.30 – 22.73 μm
Longueur du bec	30.86 – 114.40 μm	61.28 – 186.57 μm	56.84 – 224.78 μm	34.24 – 130.4 μm
Nombre de septation H	1 - 9	1 - 7	0 - 3	0 - 8
Nombre de septation V	1 - 12	2 - 11	1 - 19	1 - 10

Tableau 15 Mensuration de taille des 28 isolats identifiées des 04 espèces d'*Alternaria* spp.

Isolat	Hyphe (µm)	conidie (µm)		Bec (µm)	Nombre de septation	
	Largeur hyphe	Longueur conidie	Largeur conidie	Longueur bec	Horizontal	vertical
DA002	5,6395	77,774	13,082	144,791	0-3	4-10
DA007	5,23	66,14	13,16	151,8	0-3	4-9
DA003	21,68	80,119	13,69	125,74	1-3	2-11
DA009	6,61	52,62	17,4	80,82	0-7	3-7
DA038	6,74	73,69	18,4	123,75	1-7	4-10
DA047	6,8	78,69	16,79	103,14	1-5	4-14
DA052	6,64	66,91	17,44	149,85	1-4	3-10
DA054	14,64	163,42	38,96	150,12	1-5	3-11
DA060	26,92	258,44	64,42	253,82	1-5	2-8
DA099	6,82	63,34	16,92	269,17	1-5	2-10
DA152	7,21	66,86	18,226	186,83	1-7	2-9
DA154	21,88	399,05	51,18	407,74	1-5	3-19
DA156	7,48	60,72	17,37	117,03	1-3	1-9
DA008	6,93	59,55	15,53	105,49	0-9	4-10
DA014	5,51	58,76	16,11	39,95	1-8	2-8
DA019	6,53	60,79	16,51	82,22	1-7	1-9
DA025	6,82	83	30,56	78,06	1-6	5-12
DA057	18,78	251,9	58,99	197,91	1-7	2-9
DA090	5,23	49,46	19,62	52,57	1-2	3-7
DA094	6,24	64,76	17,15	17,15	1-4	3-8
DA113	6,84	76,12	16,31	160,27	1-4	4-10
DA114	5,52	69,88	18,25	71,77	1-2	2-9
DA140	18,86	199,43	48,74	148,63	1-3	3-8
DA141	15,89	200,62	36,16	111,92	1-2	2-8
DA145	6,1	54,92	12,82	61,28	1-3	2-7
DA062	14,9	171,86	44,28	267,89	1-6	2-9
DA082	5,29	53,49	17,46	57,9	1-8	1-9
DA086	5,59	66,54	16,8	76,31	0-8	3-10

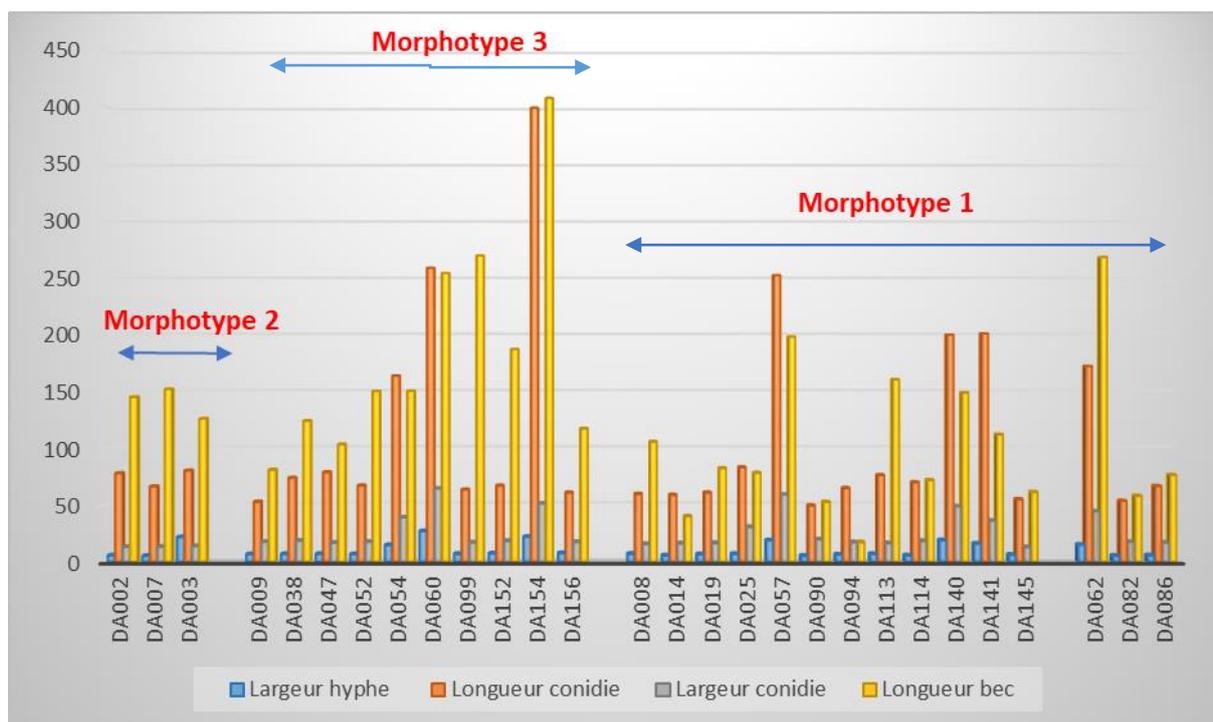


Figure 22 : Taille moyenne des conidies des 03 morphotypes d'*Alternaria* spp.

III.4. Exigences biologiques des *Alternaria* spp. sur la croissance et sporulation

III.4.1. Effet des milieux de culture sur la croissance mycélienne des *Alternaria* spp.

Les résultats de cette partie nous montrent que les 42 isolats ont présenté des croissances mycéliennes variées sur les 04 milieux de cultures PDA, PCA, V8 et TWA. Les résultats sont récapitulés par les figures (27, 28, 29 et 30), sur lesquelles nous constatons une différence dans la croissance mycélienne des 42 isolats sur le même milieu et entre les différents milieux de cultures.

Après l'incubation des 42 isolats à une température de 22°C et à l'obscurité, leur croissance optimale a été constaté au 8^{ème} jour. Nous avons constaté que la croissance était lente du 2^{ème} au 4^{ème} jour mais du 6^{ème} au 8^{ème} jour la croissance est optimale ensuite ralentie du 10^{ème} au 12^{ème} jour.

La croissance radiale maximale pour le milieu de culture PDA a été enregistré pour les isolats DA002 (37,67 mm), DA155 (37,33 mm), DA119 et DA062 (37,00 mm) et DA050 (35,33 mm) alors que sur le milieu PCA, la croissance radiale maximale a été marquée par les isolats DA147 et DA156 (38,00 mm), DA136 (37,67 mm) et DA003, DA054, DA057 et DA113 (37,33 mm). Le milieu V8 est favorable pour les isolats DA147 avec un rayon maximal de 37,33 mm, DA156 et

DA136 avec une croissance radiale maximale de 37,00 mm. Le milieu pauvre TWA a marqué sa croissance maximale pour les isolats DA136 (28,67 mm), DA001 (28,33 mm) et DA054 (27,00 mm). Au 8ème JPI, la croissance radiale pour le milieu PDA variait de 7,00 mm à 37.67 mm, celle pour le milieu PCA variait de 7,33 mm à 38,00 mm, celle pour le milieu V8 variait de 5,67 mm à 37,33 mm et enfin celle du milieu TWA variait de 3,00 mm à 28.67 mm.

La croissance de la plupart des isolats n'était pas significativement différente entre trois milieux sélectifs différents (PDA, PCA et V8), tandis que la croissance radiale enregistrée sur TWA était significativement différente. En effet, la croissance radiale de la plupart des isolats était plus faible comparativement à d'autres trois milieux le 8ème JPI.

Nous constatons qu'à partir du 2ème au 6ème JPI, la croissance radiale est rapide mais qui régresse au 8ème JPI. Nous supposons que cette régression est relative à l'âge des cultures. En effet, Tong et *al.* (1997) ont rapporté que les colonies d'*A.solani* cultivées sur le milieu de culture PSA, atteignaient 54 à70 mm de diamètre au bout du 5ème JPI.

De plus, il ya la capacité saprophytique très limité des espèces étudiées car les espèces à petites conidies présente une vitesse de croissance plus grande. Cela a été démontré par Pusz (2009) et Hubbali et *al.* (2010) que le taux de croissance des isolats de *A. alternata* et *A.mali* est respectivement très rapide du 2ème au 4ème JPI ensuite ralenti au 6ème JPI et très rapide jusqu'au 8ème JPI.

L'analyse statistique nous a permis de classer les 04 milieux de culture en 03 groupes homogènes (Tableau 16) mais cela reste insuffisant comme facteur determinant de la caracéisation culturelle des *Alternaria* spp.

Tableau 16 Classement des milieux de culture des *Alternaria* spp. en groupes homogènes selon le test LSD.

LSD test; variable -1 Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 2,7392, df = 336,0					
	PDA	-1 - Mean	1	2	3
2	TWA	2,971429		****	
4	V8	5,202381			****
3	PCA	6,626984	****		
1	PDA	6,789683	****		

Nous concluons donc que le paramètre du milieu de culture ne peut être déterminant dans la caractérisation des *Alternaria* spp.

III.4.2. Effet des milieux de culture sur la sporulation

Le tableau 17 nous récapitule l'effet des différents milieux de cultures sur les sporulations des isolats d'*Alternaria* spp. Les conditions de sporulation *in vitro* sont difficilement maîtrisables pour les espèces à grandes conidies. Diverses techniques pour induire la sporulation des *Alternaria* spp à grande conidies ont été décrits (Rands 1917b ; Mc Callan & Chan, 1944 ; Barksdale, 1969 ; Lukens 1963 ; Lukens et Horsfall, 1969).

Nous constatons d'après les résultats sur les techniques utilisées *in vitro* relatifs à l'effet de plusieurs milieux de cultures sur la sporulation des 42 isolats d'*Alternaria* spp, que le pouvoir de sporulation de l'espèce *A. linariae* est presque nul par rapport aux 03 autres espèces. On suppose donc que le milieu ne joue presque aucun effet sur cette espèce naturellement difficile à sporuler. Rotem (1994) et d'autres chercheurs ont publié leurs difficultés à réaliser la sporulation de "*Alternaria solani*" en culture. Il a suggéré, sur la base de leurs publications, que les lacunes dans leur travail culturel et les observations ne proviennent pas d'*A. solani*, le pathogène de la pomme de terre, mais d'autres espèces d'*Alternaria* - très probablement *A. tomatophila* et ses hôtes de tomates.

A. alternata était considéré comme saprophyte (Jones et Grout, 1897), mais reconnu par la suite comme une espèce pathogène. Aujourd'hui cette dernière espèce est même considérée comme responsable de nouvelles infections sur pomme de terre et différente de l'*alternariose* classique, dénommée brown spot (Nolte, 2008) ou leaf blight (Waals et al., 2011.). Récemment beaucoup d'isolats de cette espèce obtenus en Algérie par Bessadat et al., (2016) ont été considérés comme pathogènes à la suite de symptômes typiques d'*alternariose* obtenus par des inoculations artificielles. Ces nouvelles données attribuant également l'*alternariose* causée par des espèces à petites conidies telle *A. alternata*, compliquent davantage l'attribution d'un symptôme donné à une espèce donnée d'*Alternaria*. Ainsi, comme rapporté par Cardoso (2014) l'aspect culturel des isolats obtenus en boîte de Petri ne présentent pas de corrélation avec le symptôme d'une espèce donnée d'*Alternaria*, aussi bien sur pomme de terre que sur tomate.

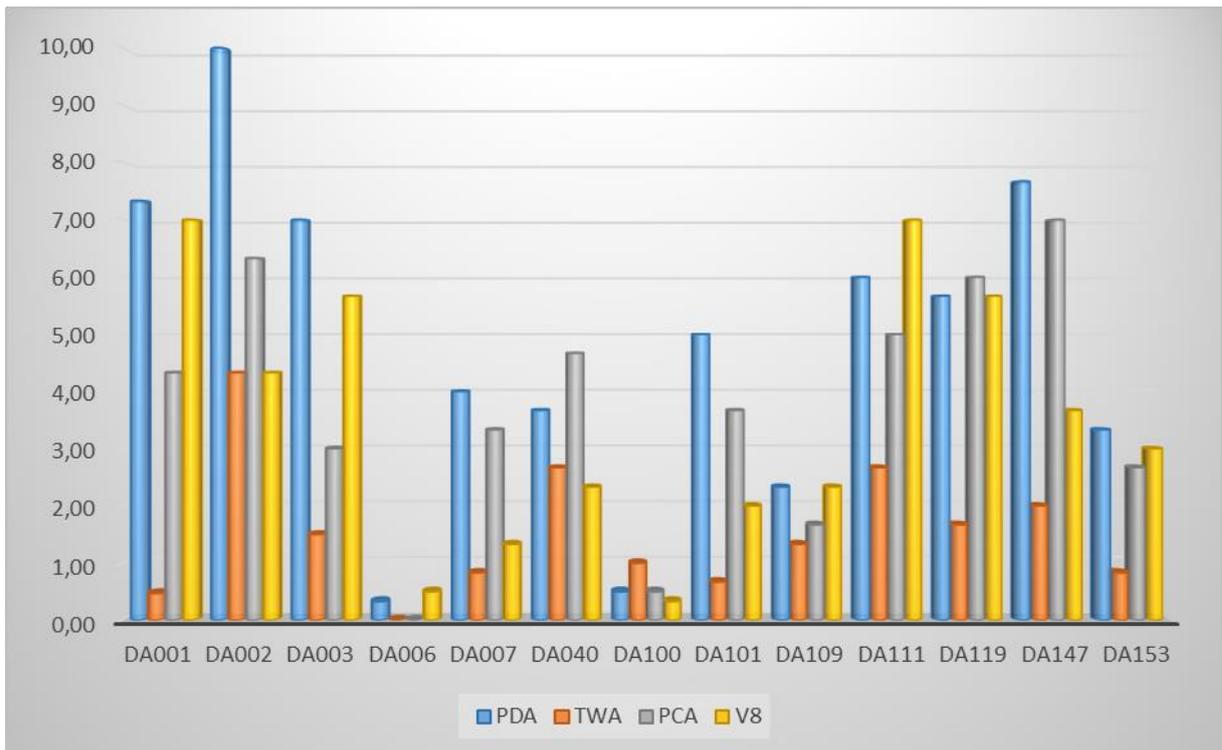


Figure 27 Effet des différents milieux de cultures sur la croissance mycélienne d'*A.linariae*.

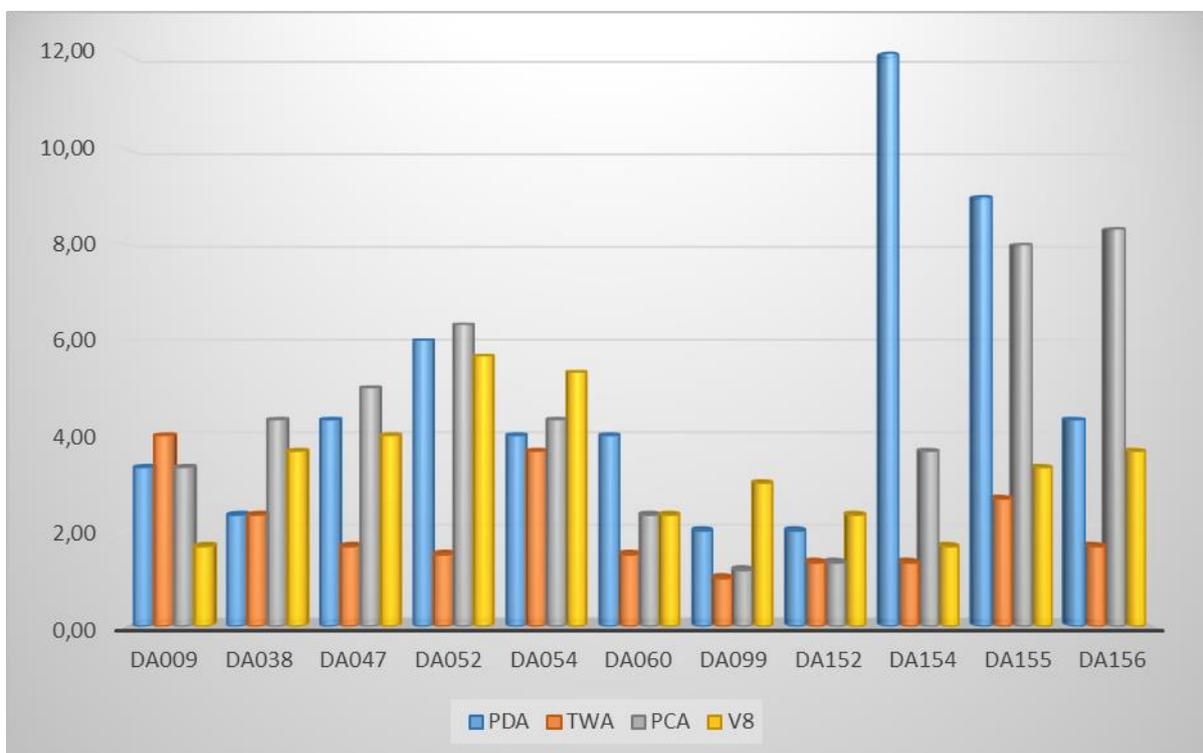


Figure 28 Effet des différents milieux de cultures sur la croissance mycélienne d'*A.grandis*.

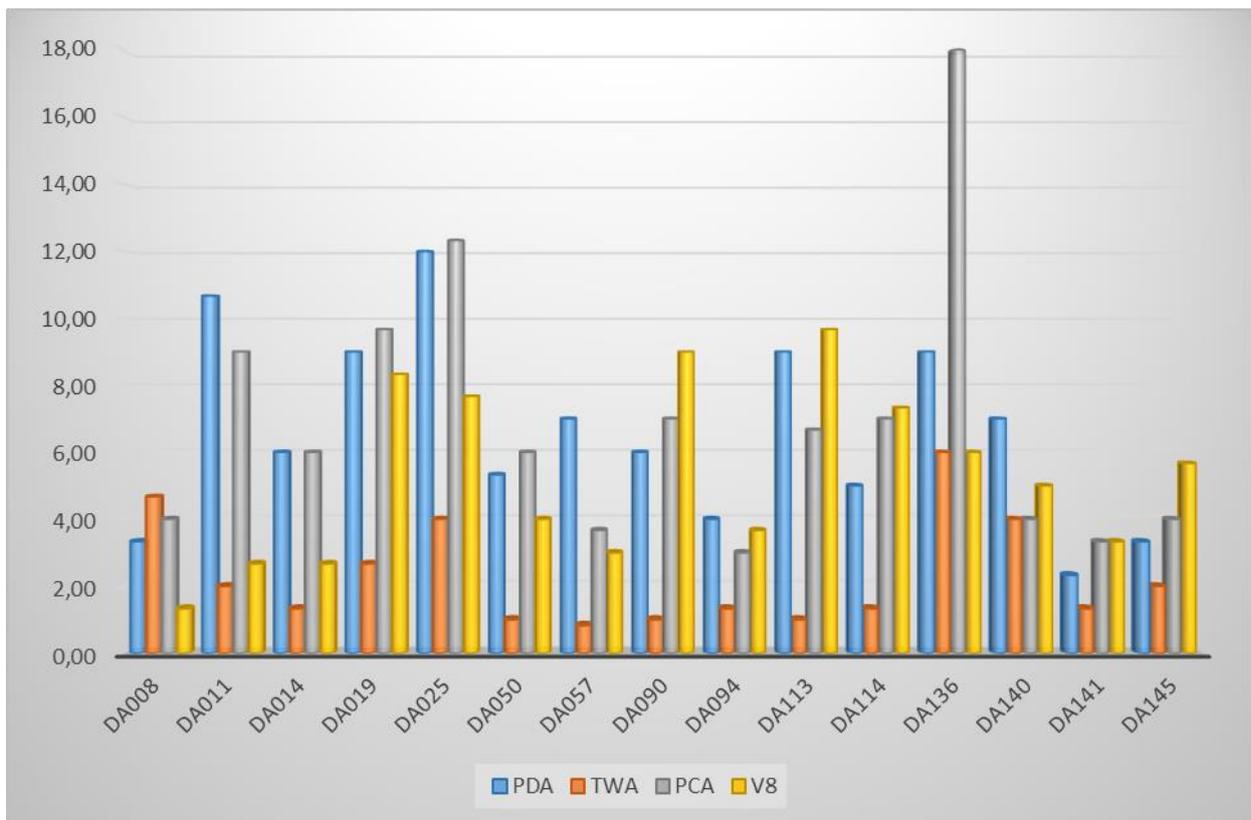


Figure 29 Effet des différents milieux de cultures sur la croissance mycélienne d'*A. solani*.

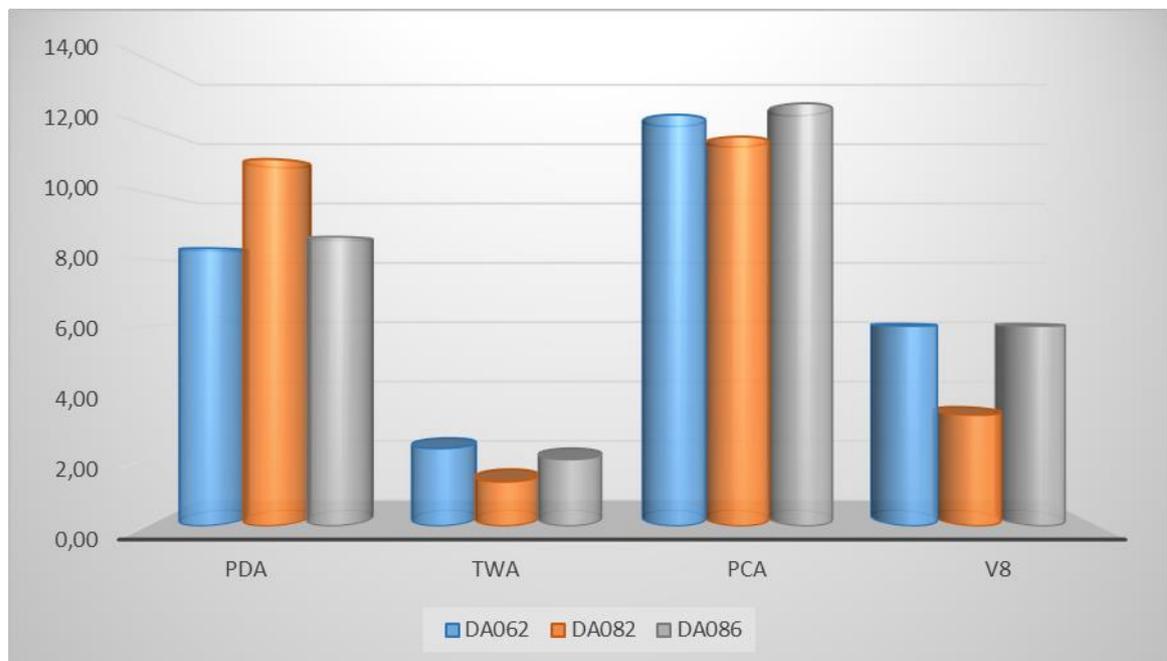


Figure 30 Effet des différents milieux de cultures sur la croissance mycélienne d'*A. protenta*.

Cela est confirmé par les résultats que nous avons obtenus, puisque nous avons obtenu un grand nombre d'isolats d'*Alternaria* à petites conidies à partir des mêmes symptômes que ceux à partir desquels ont été obtenus des espèces d'*Alternaria* à grandes conidies. Nous signalons également l'absence de corrélation entre la présence de halo jaune au niveau des symptômes et la présence de pigments sur milieu de culture et s'ils sont présents, ces derniers peuvent être de différentes couleurs. Aussi, la sporulation des espèces d'*Alternaria* à grandes conidies sur milieu de culture diffère selon les isolements.

D'une manière générale, il est constaté que les isolats d'*A. solani* sont beaucoup plus sporulants que les isolats d'*A. linariae*, mais ces derniers sporulent mieux lorsqu'ils sont isolés à partir de la tomate. Cette faible sporulation des *Alternaria* spp à grandes conidies lors des isolements, confirme les difficultés rencontrées par les divers auteurs à faire sporuler toutes ces espèces à grandes conidies, notamment après plusieurs repiquages, et a contraint des auteurs à expérimenter la qualité de la lumière, la température et les milieux de cultures.

Pour le milieu PDA, la sporulation s'est avérée faible contrairement au milieu TWA qui a permis la sporulation de presque la totalité des isolats des 03 espèces (Fig.31) excepté *A. linariae*. En effet, la sporulation est inhibée par les sucres, qui favorisent la croissance végétative et même la production de conidiophores (Waggoner et Horsfall 1969, Rotem 1994). La température d'incubation est très importante pour la production des conidies in vitro car les conidies ne se forment pas à des températures supérieures à 20 ou 23 ° C (Lukens 1963 ; Waggoner et Horsfall 1969, Pscheidt 1985).

La lumière NUV n'a pas agit sur les conidiophores qui d'après (Rich & Tomlinson, 1968) sont facilement endommagés par la lumière NUV, et la formation des conidies est initiée par la lumière. C'est peut-être (Lukens et Horsfall 1969) qui ont raison par leur rapport que les conidiophores nécessitent une courte période de lumière pour induire la formation des conidies et qui par la suite besoin de conditions sombres pour se développer (Fig.32).

In vivo, la sporulation du pathogène est affectée par l'état de l'hôte et tend à accélérer avec une augmentation de la formation de tissu nécrotique et une diminution de la photosynthèse (Cohen & Rotem 1970).

D'après la littérature, *A. solani* ne sporule pas facilement dans la culture si on le laisse tranquille. Des facteurs tels que la blessure du mycélium, température et la lumière affectent la formation de conidies. Pour les 02 milieux PCA et V8, nous constatons que le facteur de produire des plaies sur le mycélium a favorisé la sporulation des conidiophores. En effet, Rands (1917b) a réussi la production des conidies après la culture de *A. solani* sur milieu PDA pendant 10 à 12 jours, le déchiquetage les cultures et leur séchage au soleil. Barksdale (1969), McCallan & Chan (1944) ont utilisé une technique similaire. *A. solani* a été cultivée sur milieu PDA, les cultures raclées sont ensuite placées dans boîtes de Pétri humides à couvercles légèrement entrouverts ensuite exposées au soleil ou sous la lumière NUV. Rotem & Reichert (1964) ont indiqué que la production de conidies est induite par inhibition de la croissance végétative du champignon.

Le milieu V8 contenant CaCO₃ semble encore meilleur que PCA. En effet, Shahin & Shepard (1979) rapportent qu'en cultivant le champignon sur milieu PDA, coupant la culture dans 1 mm 2 blocs et en les plaçant sur un support CaCO₃ dans l'obscurité à la température ambiante a également été trouvé pour induire la formation de conidies.



Figure 31 Aspect sporulant sur le milieu de culture TWA.



Figure 32 Aspect des conidies en bouquet sur les conidiophores.

Tableau 17 Effet des différents milieux de cultures sur la sporulation des *Alternaria* spp.

Espèce	Code isolat	PCA	PDA	TWA	V8
	DA001	-	-	-	-
	DA002	-	-	-	+
	DA003	-	-	-	-
	DA006	-	-	-	-
	DA007	-	-	-	+
	DA040	-	-	-	-
<i>A.linariae</i>	DA100	-	-	-	+
	DA101	-	-	-	-
	DA109	-	-	-	-
	DA111	-	-	-	-
	DA119	-	-	-	-
	DA147	-	-	-	-
	DA153	+	-	++	+++
	DA009	-	-	+	++

	DA038	-	-	++	+
	DA047	-	-	++	+
	DA052	-	-	+	+
	DA054	-	-	+	-
A.grandis	DA060	++	+	++	++
	DA099	+++	-	+++	+++
	DA152	-	-	++	+
	DA154	-	-	++	+
	DA155	+	-	++	+
	DA156	+	-	+++	++
	DA008			+++	+++
	DA011			-	-
	DA014	++	+	+++	++
	DA019			+++	++
	DA025			+++	++
	DA050	-	-	-	-
	DA057	+++	++	+++	+++
A.solani	DA090	+++	-	++	+++
	DA094	++	-	++	++
	DA113	+	-	++	+
	DA114	+++	-	++	+++
	DA136	-	-	-	-
	DA140	+++	-	++	++
	DA141	+++	-	+++	++
	DA145	+++	-	++	++
	DA062	-	-	+++	++
A.protenta	DA082	+	-	+++	+
	DA086			++	+
-	Non sporulé				
+	Faible sporulation				
++	Moyenne sporulation				
+++	Forte sporulation				

III.4. 3. Effet de la température du milieu sur la croissance des *Alternaria* spp.

La température reste le facteur environnemental le plus important pour le développement des maladies fongiques. D'après nos résultats illustrés dans les figures (33, 34, 35 et 36), nous constatons après le 8^{ème} JPI, que tous les isolats ont marqués une croissance optimale entre 25 et 30°C suivi de 20°C. Nous constatons aussi que la température 10°C permet le développement des *Alternaria* spp et 35°C n'est pas aussi mauvaise pour la croissance et le développement des *Alternaria* pathogènes à grandes conidies. La seule température qui semble avoir un effet inhibiteur est 5°C. Pour *A. linariae*, la croissance radiale optimale à été enregistrée à 30°C (33, 95mm) suivi de 25°C (26,46mm). La croissance radiale enregistrée à 35°C est presque similaire à celle enregistrée à 5°C est respectivement de 4.92mm et 4.18mm.

Pour *A. grandis*, la croissance optimale a été enregistrée aussi à 30°C (31,00mm) puis à 25°C (27,39mm). Les deux températures extrêmes à savoir 35 et 5°C ont enregistrées une croissance radiale de respectivement 5,97mm et 3,98mm. Quant à *A. solani*, la croissance radiale optimale à été enregistrée à 30°C (29,71mm) puis à 25°C (28,60mm) et presque pareil à 35°C et 5°C avec des croissances radiales de respectivement 4,22mm et 4,53mm. Nos résultats sont en accord avec ce qu'a rapporté Tong et al. (1997) que la température optimale pour la croissance d'*A.solani* est entre 23 et 28°C et Tsedaley (2014) que la germination des conidies des *Alternaria* spp est favorisée par l'humidité libre, mais peut être induite par une humidité relative proche de la saturation. Avec une dose d'inoculum favorable et la période de mouillage, la température minimale de l'infection peut être aussi basse que 10°C, la maximale supérieure à 35°C, et l'optimum entre 20°C et 30°C. L'analyse statistique nous a permis de classer les températures en cinq groupes homogènes comme le montre le tableau 18.

Tableau 18 Classement des températures de croissance des *Alternaria* spp. en groupe homogène par le test LSD.

LSD test; variable 1 (Spreadsheet7) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 8,9491, c = 504,00							
	T°C	1 - Mean	1	2	3	4	5
1	5	5,40000	****				
6	35	6,00000	****				
3	20	16,80952		****			
2	10	21,21429			****		
4	25	28,86508				****	
5	30	32,17460					****

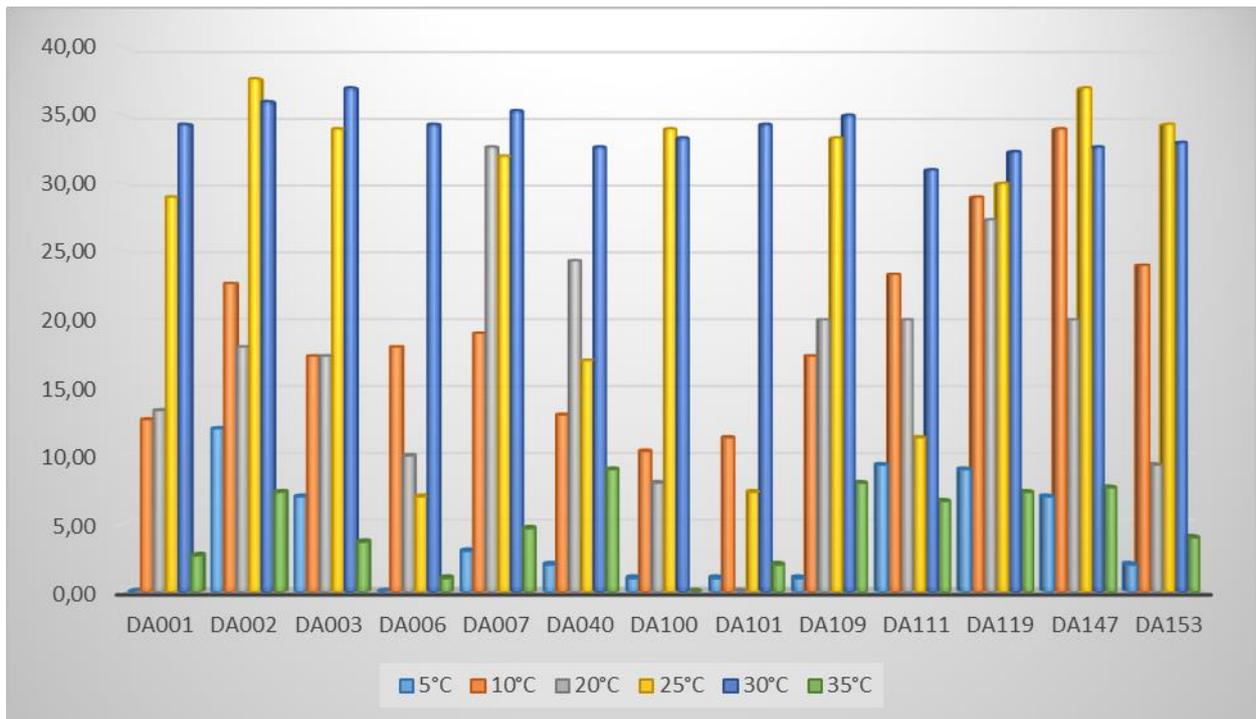


Figure 33 Effet de la température sur la croissance mycélienne d'*A. linariae*.

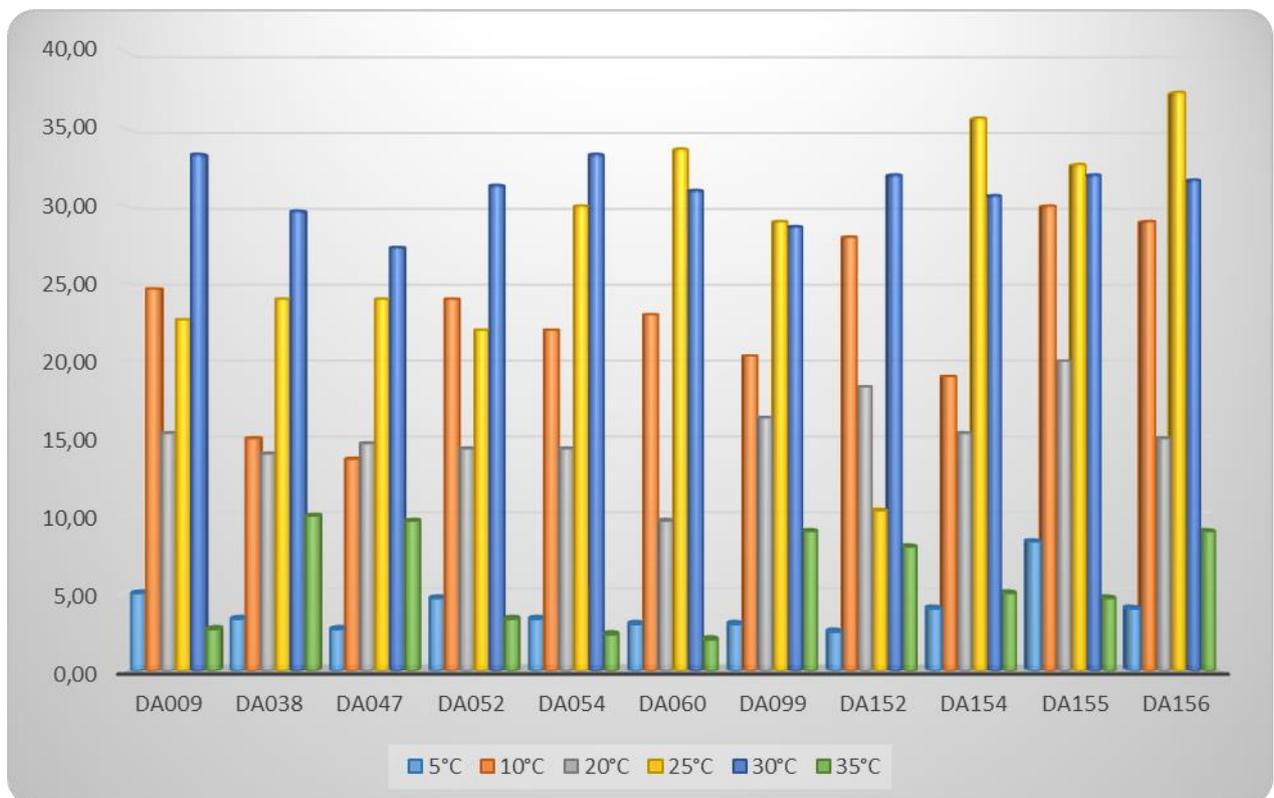


Figure 34 Effet de la température sur la croissance mycélienne d'*A. grandis*.

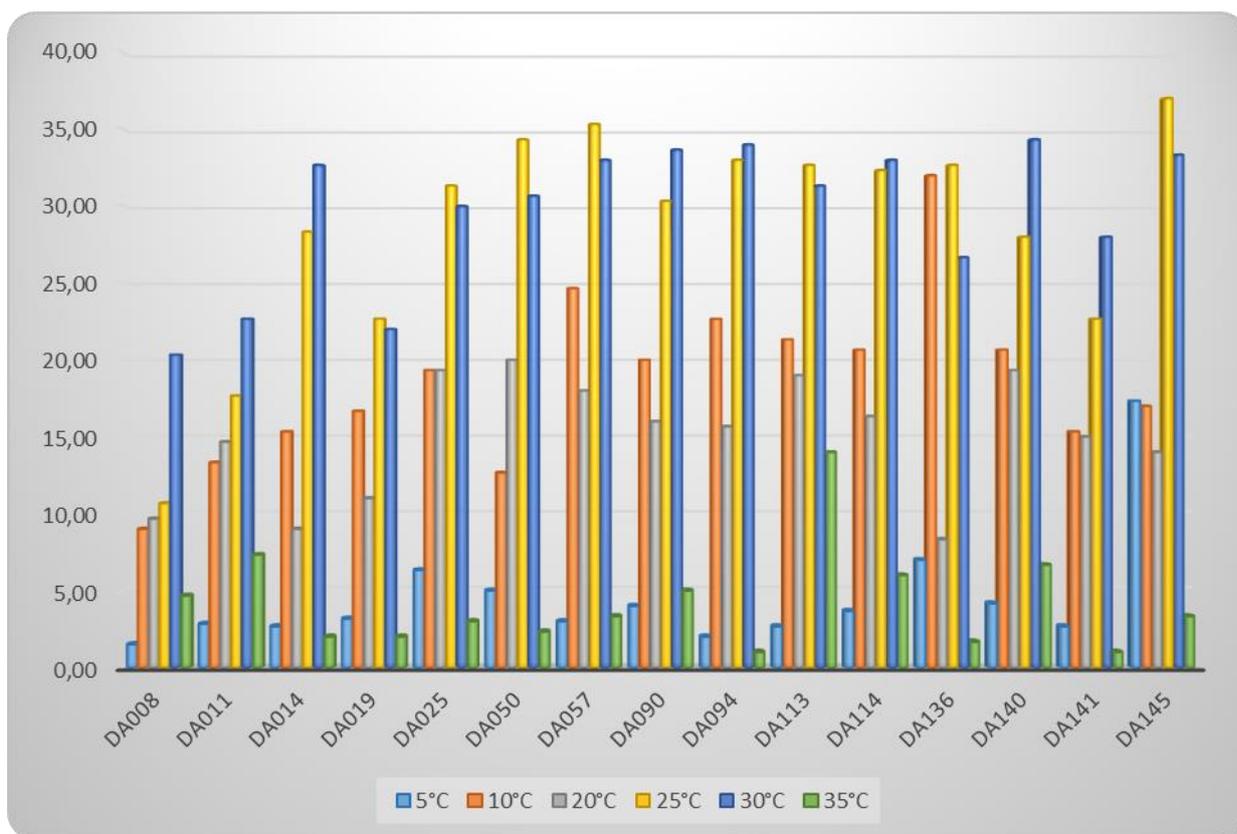


Figure 35 Effet de la température sur la croissance mycélienne d'*A. solani*.

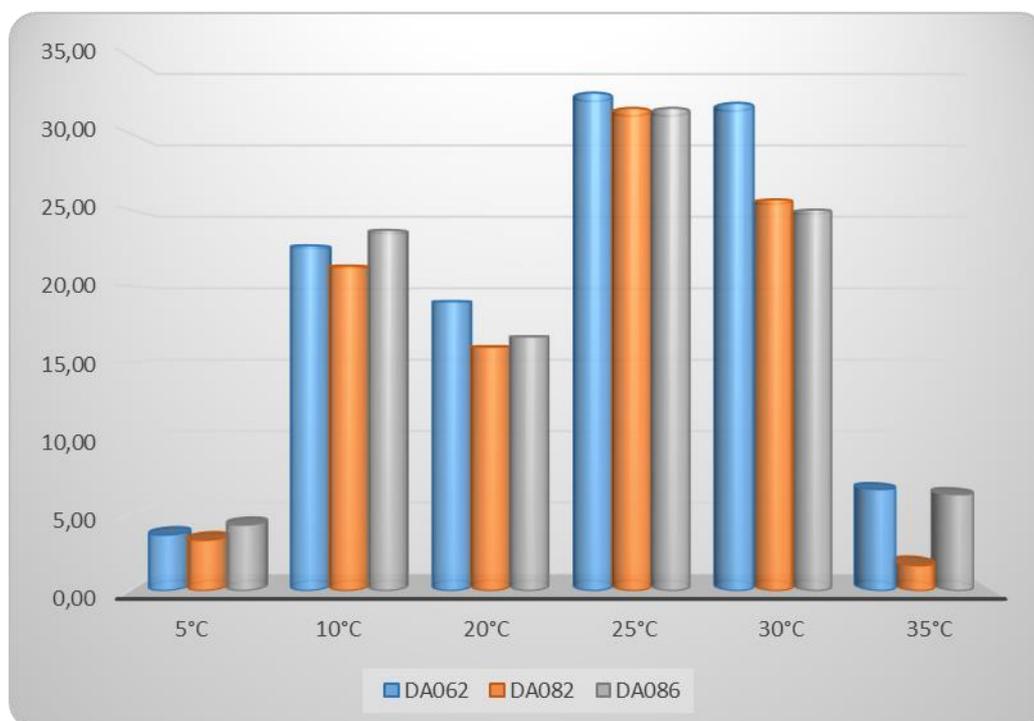


Figure 36 Effet de la température sur la croissance mycélienne d'*A. protenta*.

III.4.4. Effet du pH du milieu sur la croissance des *Alternaria* spp.

Le pH est un facteur aussi important que la température pour la croissance et le développement des champignons phytopathogènes. D'après Madan et Thind (1998), la croissance est le développement des champignons est optimale dans des milieux à pH neutre ou peu acide. D'après nos résultats, le pH optimal pour la croissance radiale des isolats étudiés est 7. Néanmoins, tous les isolats testés ont une très bonne croissance à des pH de 8 et 9.

Cela est confirmé par une analyse statistique qui a classé les pH 7,8 et 9 dans un même groupe comme le montre le tableau 19. Une bonne croissance radiale à des pH de 5 et 6. De plus, la croissance radiale est au ralenti mais n'est pas nulle à des pH de 4 et 10. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par plusieurs auteurs (Sarbhoy, 1965 ; Dongo, 2005 ; Khalaf, 2012 et Bessadat, 2014) (Figs. 37, 38, 39 et 40).

Tableau 19 Classement des pH de traitements de croissance des *Alternaria* spp. selon le test LSD.

LSD test; variable croissance (mm) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 9,4325, d = 588,00						
	pH4	croissance (mm) - Mean	1	2	3	4
1	4	13,06746				****
2	5	24,34127		****		
3	10	24,65079		****		
4	9	26,07143	****			
5	7	26,22222	****			
6	8	26,57937	****		****	
7	6	27,12698			****	

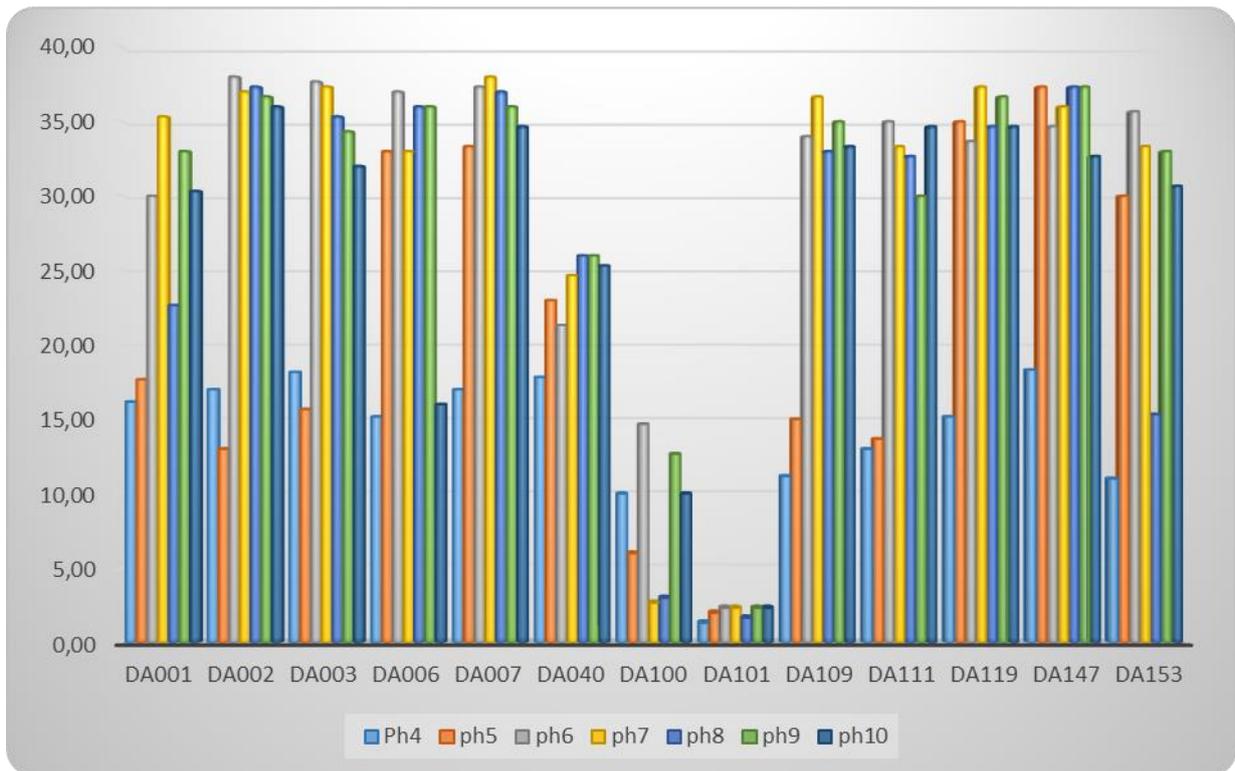


Figure 37 Effet du pH sur la croissance mycélienne d'*A. linariae*.

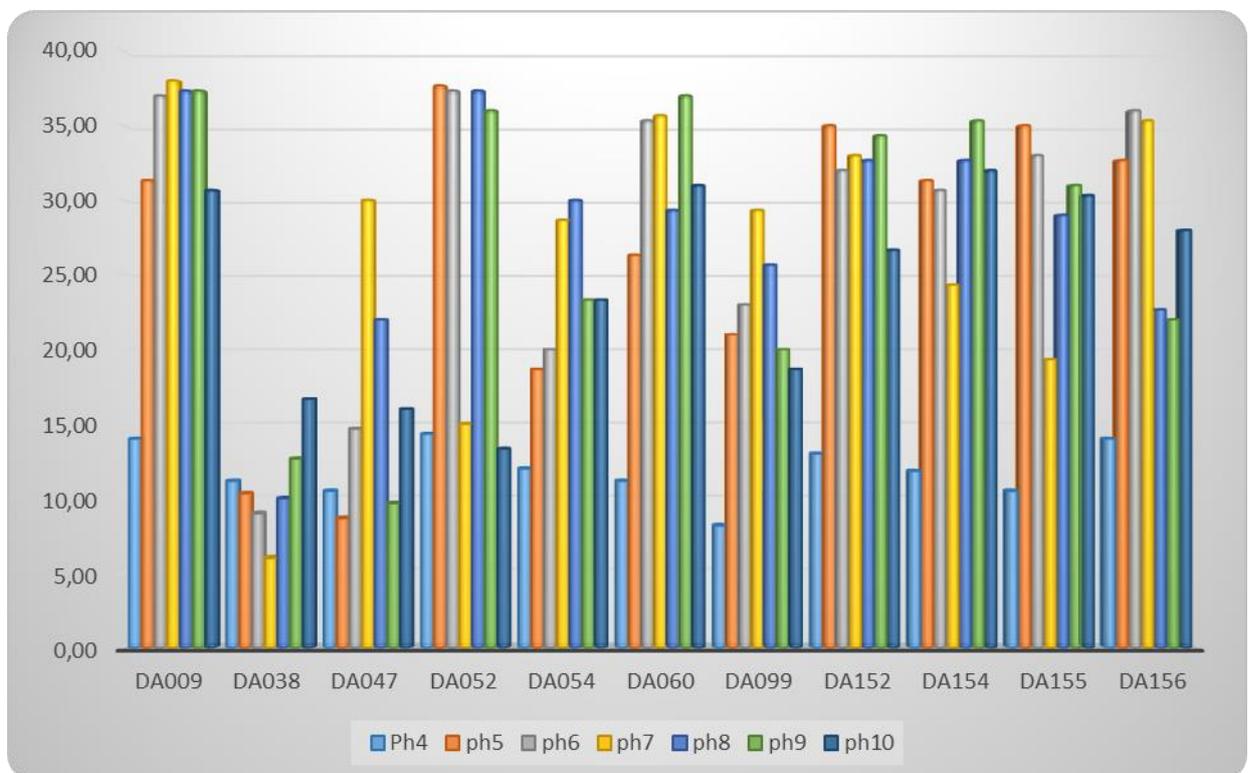


Figure 38 Effet du pH sur la croissance mycélienne d'*A. grandis*.

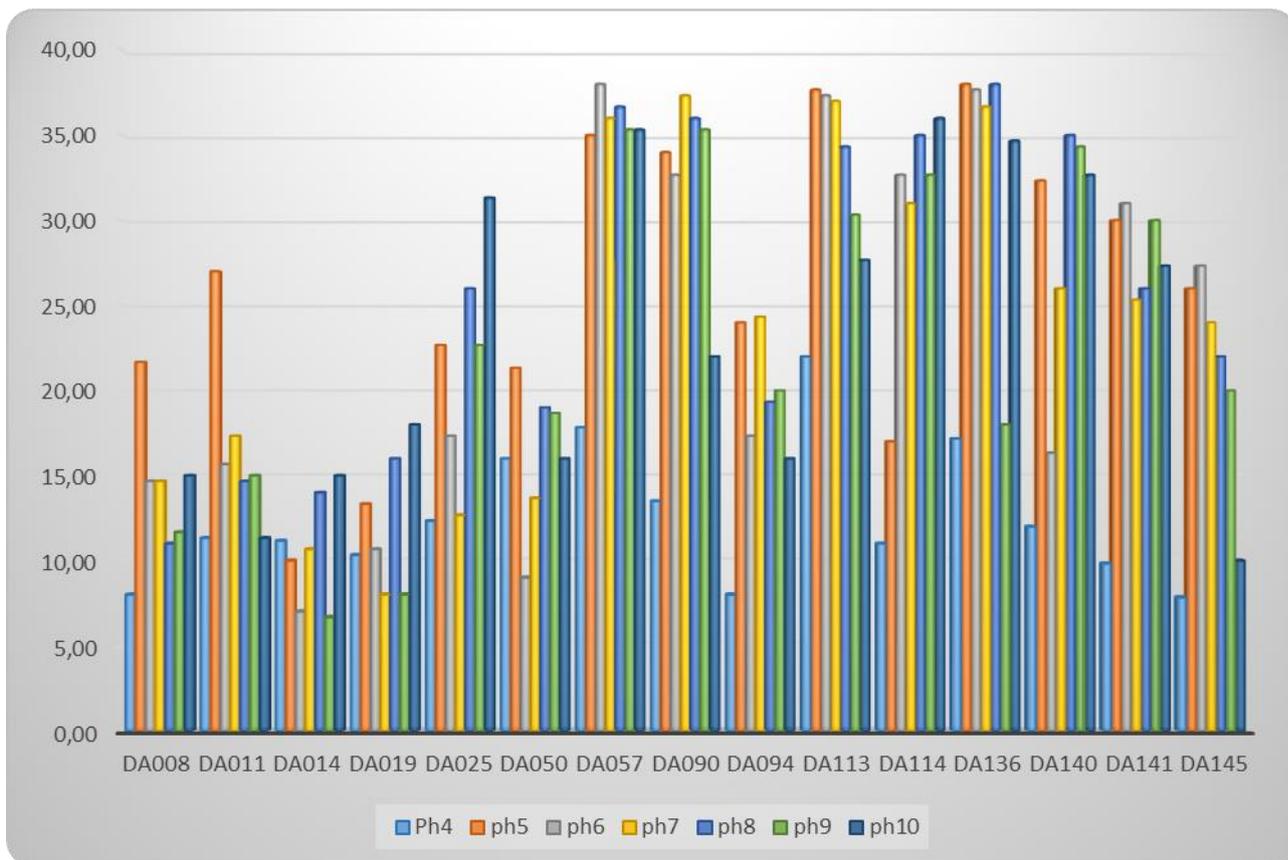


Figure 39 Effet du pH sur la croissance mycélienne d'*A. solani*.

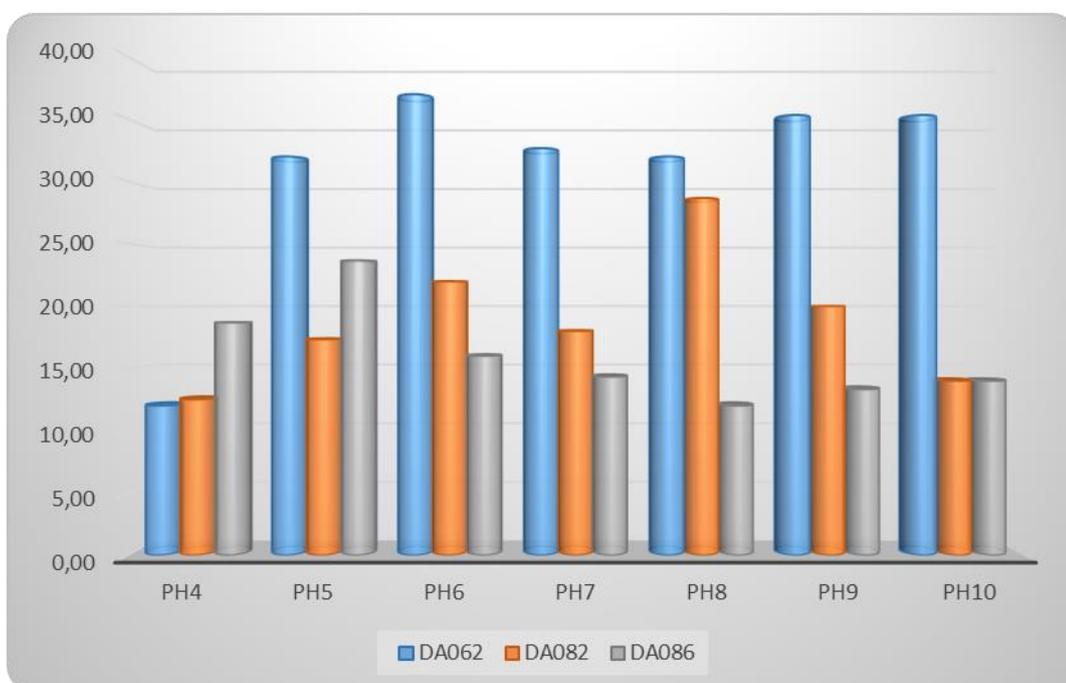


Figure 40 Effet du pH sur la croissance mycélienne d'*A. protenta*.

III.5. Distribution géographique et prévalence des *Alternaria* spp. sur la culture de pomme de terre et tomate selon les étages bioclimatiques en Algérie

Les tableaux 20 et 21 nous récapitulent l'enquête menée sur la distribution et la prévalence des 04 espèces d'*Alternaria* à grandes conidies dans les 4 zones géographiques de culture de la pomme de terre et de la tomate en Algérie, à savoir *A. solani*, *A. grandis*, *A. linariae* et *A. protenta* à des niveaux variables (fig. 41). Les résultats obtenus montrent que leur fréquence varie selon la plante hôte (pomme de terre et tomate) et selon les régions géographiques (Est, Centre, Ouest et Sud). Nous constatons que l'espèce *A. solani* est la plus commune en Algérie avec 63 %. Cette espèce a une fréquence d'isolement significative dans le sud (30,40%) et une fréquence relativement faible dans l'est (14,86%) et dans le centre et l'ouest (8,78%) (fig. 42).

A. solani est suivi par *A. linariae* avec 25 % et plus fréquemment rencontrée sur tomate sa plante hôte. *A. grandis* est présent avec un faible niveau (10 %) et *A. protenta* dans deux sites seulement au Sud dans deux parcelles à El Oued et à l'Ouest dans une seule parcelle. Les fréquences d'isolement des quatre espèces identifiées en Algérie varient également avec la culture (Fig. 43). *A. solani* attaque à la fois la pomme de terre et la tomate, mais elle est plus répandue sur pomme de terre (50,60%) que sur tomate (12,15%).

En revanche même si *A. linariae* présente un pourcentage plus faible que *A. solani*, elle montre un % plus élevée sur tomate que sur pomme de terre ; *A. grandis* vient à la troisième place avec un % plus élevé sur pomme de terre (9) que sur tomate (5). Enfin *A. protenta* est détecté pour la première fois en Algérie, mais il reste présent avec un pourcentage relativement très faible sur les deux cultures.

Tableau 20 Répartition des *Alternaria* spp. à grandes conidies selon les régions bioclimatiques d'Algérie.

Régions	<i>A. solani</i>	<i>A. grandis</i>	<i>A. linariae</i>	<i>A. protenta</i>	Total
Est	3	0	1	0	4
Ouest	13	7	7	1	28
Centre	32	7	17	0	56
Sud	45	0	12	2	59
Total	93	14	37	3	147

Tableau 21 : Prévalence des quatre espèces *Alternaria* à grandes conidies selon les plantes-hôtes (pomme de terre et tomate).

Origine de la plante hôte	<i>Espèces</i>		
	<i>A. solani- A protenta</i>	<i>A. grandis</i>	<i>A. linariae</i>
Pomme de terre	80.2 ^a - 82.8 ^b	64.3 - 9.6	18.9 - 7.5
Tomate	19.8 - 35.2	35.7 - 9.2	81.1 - 55.6
Origine géographique (zone bioclimatique)			
Méditerranéen (humide/subhumide)	16.7 - 39.0	50.0 - 17.0	48.6 - 44.0
Semi-aride	34.3 - 70.2	50.0 - 14.9	18.9 - 14.9
Aride	49.0 - 79.7	0 - 0	32.4 - 20.3

^a pourcentage du nombre total d'isolats indépendamment de la plante hôte ou de l'origine géographique

^b pourcentage du nombre total d'isolats provenant du même hôte ou de la même origine géographique

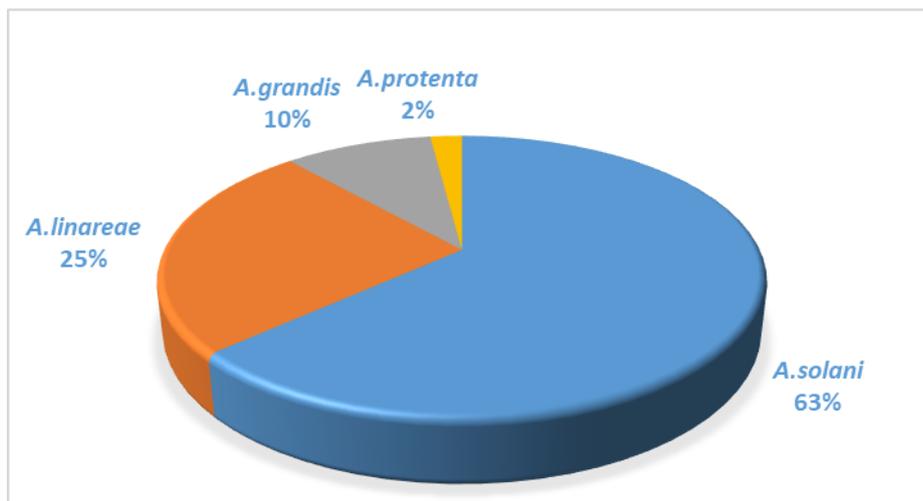


Figure 41 Distribution géographique des *Alternaria* spp. en Algérie.

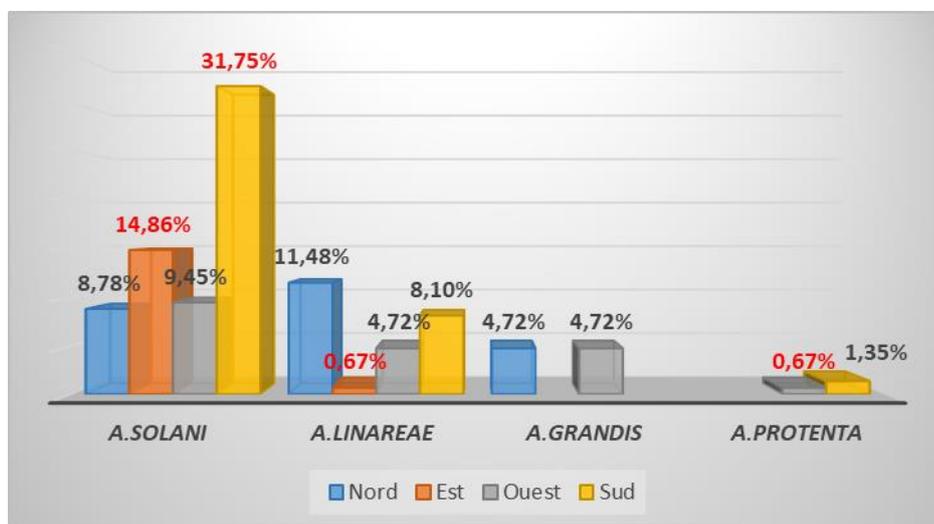


Figure 42 Distribution des *Alternaria* spp. en Algérie par espèce.

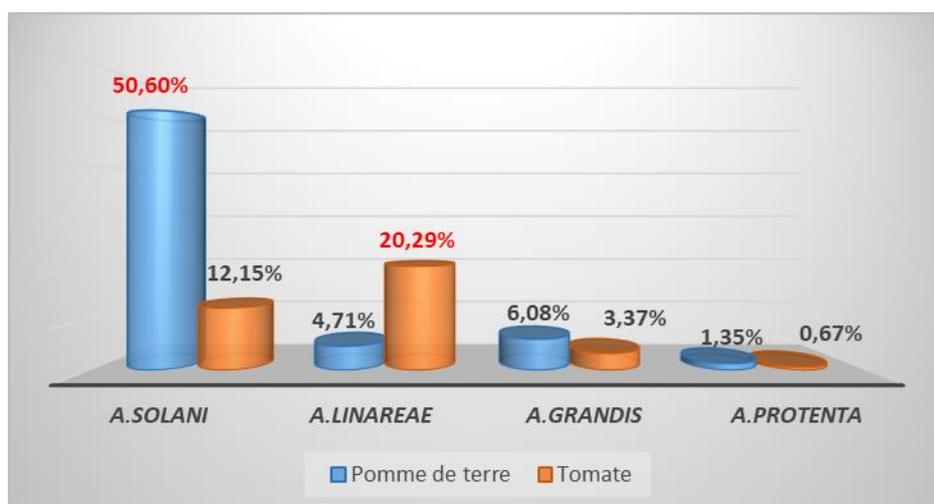


Figure 43 Distribution des *Alternaria* spp. par culture.

Par rapport aux espèces pathogènes inféodées à l'*alternariose* de la pomme de terre et la tomate, les résultats obtenus au cours de 3 campagnes agricoles, montrent une large distribution des espèces d'*Alternaria* à grandes conidies, dans toutes les régions de production de la pomme de terre et tomate et ce dans les différents étages bioclimatiques du pays. Néanmoins nous relevons l'absence d'*A. grandis* dans les régions sahariennes caractérisées par des périodes relativement chaudes de l'année. Dans les autres régions il est noté notamment la prédominance des deux espèces pathogènes sur leurs deux plantes hôtes respectives, avec *A. solani* sur pomme de terre et *A. linariae* sur tomate et ce dans la plupart des zones prospectées (La gamme d'hôtes d'*A. grandis* et *A. linariae* = *A. tomatophila* est inconnue : Cardoso, 2014). En plus de ces espèces et grâce aux nouveaux moyens d'investigation moléculaires, nos présents résultats confirment qu'il y a d'autres espèces à grandes conidies qui sont de plus en plus détecté à des taux plus faibles tels *A. grandis* sur pomme de terre déjà signalé et décrit par Simmons (2000) comme une nouvelle espèce sur pomme de terre et retrouvée par la suite dans plusieurs autres pays. D'abord au Brésil (Rodrigues et al, 2010 ; Cardoso, 2014), en Europe et notamment en Belgique (Landshoot et al., 2017) ainsi qu'en Algérie (Bessadat, 2016).

III.6. Pathogénicité et spécialisation parasitaire des espèces d'*Alternaria* spp. à grandes conidies sur pomme de terre et tomate

III.6.1. Pathogénicité et spécialisation parasitaire sur folioles détachées

Les résultats obtenus des inoculations croisées après une période d'incubation de 10 jours, ont montré la capacité d'infection de l'ensemble des isolats sur toutes les variétés testées pour les deux cultures de pomme de terre et tomate. Le degré d'attaque varie clairement entre les isolats des différentes espèces d'*Alternaria* spp. Ainsi que d'une variété à une autre. Le tableau 22 nous récapitule le degré d'attaque selon l'échelle de notation utilisé de 1 à 10.

Tableau 22 Degrés d'attaque des isolats des 04 espèces d'*Alternaria* identifiées sur une échelle de notation de 1 à 10.

Isolats	Pomme de terre		Tomate	
	Spunta	Sarpo Mira	Saint Pierre	Marmande
<i>A. linariae</i>				
DA002	6,3	8	9	6
DA003	9,5	2	8,8	9,5
DA153	9	8	7,8	5,3
<i>A. solani</i>				
DA008	7,8	7,3	6,3	5,3
DA009	7,8	7,3	6,3	3,8
DA114	7,8	8,8	9,5	7,5
DA140	8	10	8,5	5,5
DA141	2,5	8,5	8,3	6,5
<i>A. grandis</i>				
DA060	5	6,8	6	4,5
DA099	8,5	8	9,5	7,3
DA152	7,5	7,5	7	6,3
<i>A. protenta</i>				
DA062	4,3	9	7,5	3,8
DA082	8,5	9,5	8,5	7,5

Concernant l'espèce *A. linariae*, l'attaque est d'une grande sévérité pour les isolats DA002, DA003 et DA153 sur les deux cultures et sur respectivement les variétés Saint pierre de la tomate avec un degré d'attaque de 9, les variétés Spunta de pomme de terre et Marmande de tomate avec un degré d'attaque qui a atteint le niveau 9,5 et la variété Spunta avec un degré d'attaque de 9.

Pour l'espèce *A. solani*, les deux isolat DA114 et DA141 se sont montrés très agressifs vis-à-vis des deux cultures sur les deux variétés Sarpo Mira et Saint pierre avec respectivement les degrés d'attaque de 10 et 9,5.

A. grandis a montré lui aussi une grande agressivité sur la variété Saint pierre avec un degré d'attaque de 9.5 provoqué par l'isolat DA099. Enfin pour *A. protenta* s'est attaqué à Sarpo Mira de pomme de terre avec un degré d'attaque de 9,5 (Fig. 44).

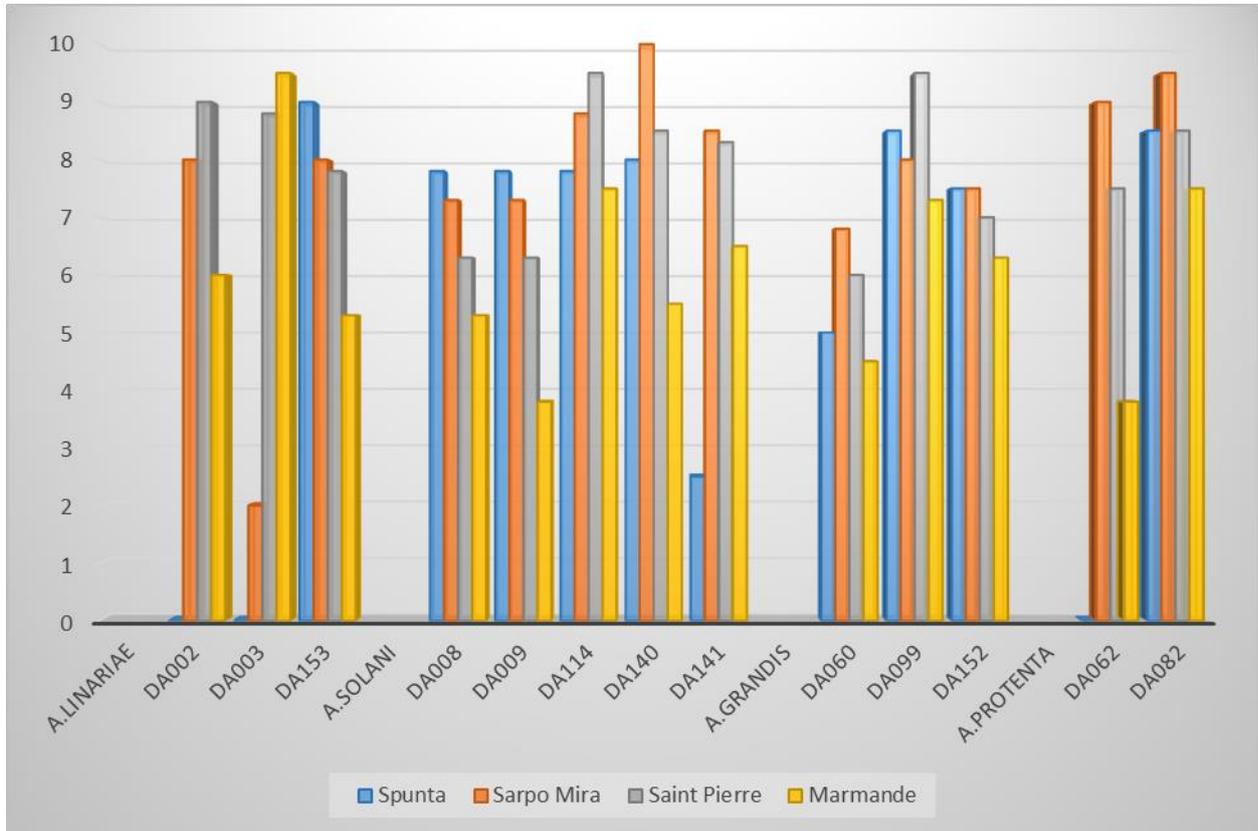


Figure 44 Degré d'attaque des isolats d'*Alternaria* spp. sur folioles détachées de pomme terre et de tomate.

L'analyse de la variance des degrés d'attaque, montre une différence très hautement significative ($P= 0,000000 \leq 0,001$) pour les facteurs étudiés (isolats et variétés), ainsi que pour leur interaction (Tableau 23).

Tableau 23 Analyse de la variance du degré d'attaque : variété / isolat.

sources	Somme des carrés	Degré de liberté	Carré moyen	F	P
Isolats	1917,5	12	159,8	13,435	0,000000
Variétés	1162,3	3	387,4	32,575	0,000000
Isolats*Variétés	6177,4	36	171,6	14,427	0,000000

Le test LSD de Fisher classe les isolats en 9 groupes homogènes comme le montre le tableau 24.

Tableau 14 Classement des isolats selon le test LSD de Fisher au seuil de 5 %.

Cellule N°	Isolats	AUDPC moyenne	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5	DA060	17	A								
8	DA062	18,56	A	B							
6	DA152	18,94	A	B	C						
10	DA141	20,63		B	C	D					
13	DA009	21,25			C	D	E				
12	DA008	21,63				D	E	F			
1	DA002	22,56				D	E	F	G		
2	DA007	23,25					E	F	G	H	
3	DA153	24						F	G	H	
11	DA114	24,44							G	H	
7	DA140	25								H	I
4	DA099	27									I
9	DA082	27,25									I

Le test LSD de Fisher classe les variétés en 3 groupes homogènes comme le montre le tableau 25.

Tableau 25 Classement des variétés selon le test LSA de Fisher au seuil de 5 %.

Cellule N°	variétés	AUDPC moyenne	1	2	3
2	Marmande	18,75		C	
3	Spunta	22,04			B
4	Sarpo Mira	23,96	A		
1	Saint Pierre	24,94	A		

III.6.1. Pathogénicité et spécialisation parasitaire sur plants entiers de pomme de terre et tomate

Pour confirmer la pathogénicité des espèces d'*Alternaria* identifiées sur les deux plantes hôtes, des essais d'inoculation sur plants en pots ont été effectués. Quatorze isolats représentant les quatre espèces *Alternaria* à grands conidies : *A. solani* (DA008, DA114, DA140, DA141), *A. grandis* (DA009, DA060, DA099, DA152), *A. protenta* (DA062, DA082, DA086) et *A. linariae* (DA002, DA007, DA153) isolés de pomme de terre ou de tomate ont été utilisés pour inoculer les deux plantes hôtes.

Les symptômes (nécrose entourée d'un halo jaune) obtenus sur des folioles détachées en boîte de Pétri ont été confirmés par les degrés élevés d'agressivité obtenus sur des plants entiers de pomme de terre et tomate (Fig. 45). Tous les isolats testés ont pu produire des symptômes sur les deux espèces de plantes indépendamment de leur origine végétale hôte (Fig. 46). Il est à noter que le degré d'agressivité de chaque combinaison hôte/pathogène varie d'un isolat à l'autre. En moyenne, les isolats d'*A.solani* étaient les plus agressifs sur tomate et pomme de terre tandis que les isolats d'*A.protenta* étaient les moins agressifs avec une préférence marquée pour leur espèce hôte originale.

Les trois espèces d'*Alternaria* (*A. solani*, *A. grandis* et *A. linariae*) isolées sur pomme de terre ou tomate ont infecté les deux plantes hôtes (Fig. 47). Cependant, il faut noter que le degré d'agressivité de chaque combinaison hôte/pathogène varie d'un isolat à l'autre.

Sur les 52 interactions hôte/pathogène (13 isolats et 4 variétés de pomme de terre et de tomate) impliquant les 3 espèces d'*Alternaria*, 42 d'entre elles présentaient des niveaux d'attaque supérieurs ou égaux à 6. La variété de tomate Saint-Pierre était plus sensible, présentant des

niveaux d'attaque supérieurs à 6, tandis que la variété Marmande, moins attaquée, a une résistance plus élevée. Nous avons également montré que *A. linariae* est pathogène sur pomme de terre en plein champ. Pour la pomme de terre, le degré d'attaque varie selon l'isolat. La variation des niveaux d'attaque signifie qu'il n'y a pas de spécialisation parasitaire d'une espèce donnée d'*Alternaria* par rapport à une plante hôte donnée. Dans cette étude, nous avons montré qu'*A. linariae* est pathogène sur pomme de terre en plein champ. Ces résultats nous permettent de confirmer l'absence de spécialisation parasitaire des trois pathogènes par rapport aux deux hôtes : pomme de terre et tomate.

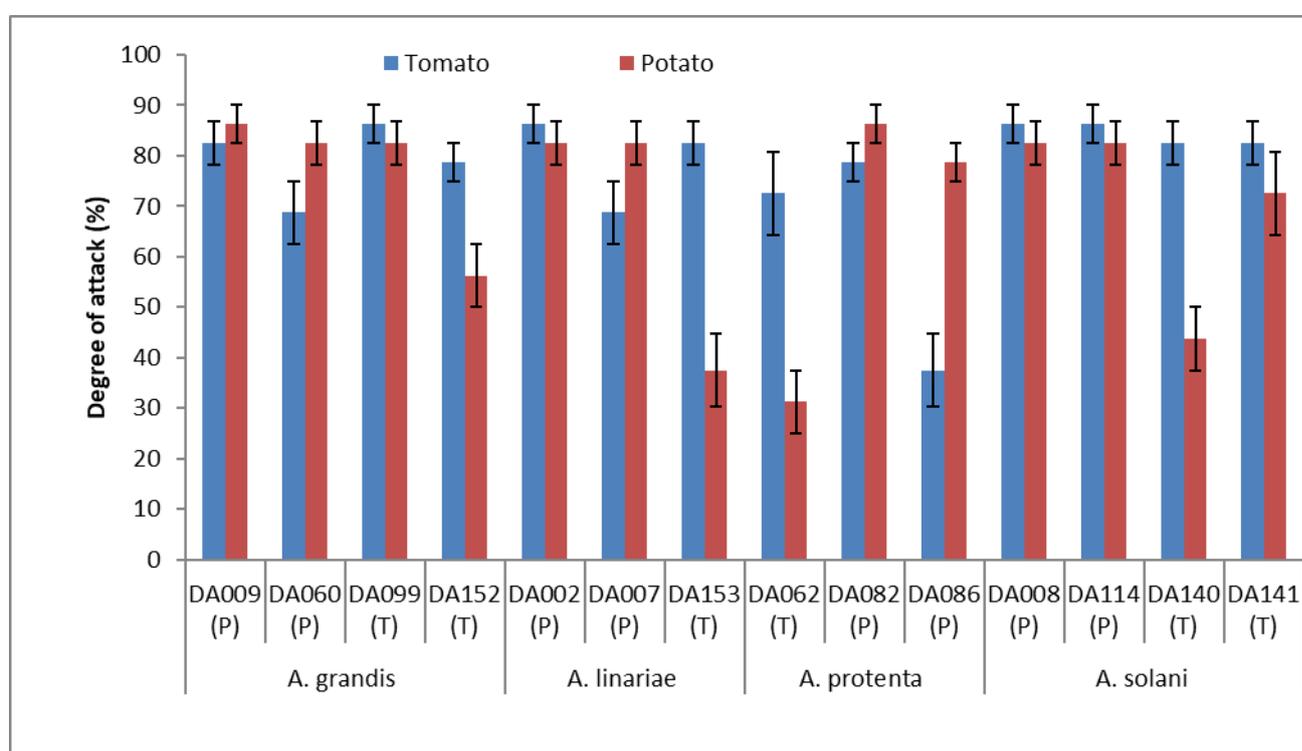


Figure 45 La gravité de la maladie a été évaluée à l'aide d'une échelle d'évaluation visuelle (0-100 %) 15 jours après l'inoculation des feuilles de tomate (barres à dos bleu) et de pomme de terre (barres rouges) avec des isolats représentant les quatre espèces d'*Alternaria* à grandes spores. Les lettres (P ou T) sous les identités des isolats font référence à la plante hôte d'origine (Pomme de terre ou Tomate).



Figure 46 Symptômes sur des folioles détachées (a, d) et des plants de tomate entier (c, e) ou de pomme de terre (b, f) inoculés par l'isolat DA002 d'*A.linariae* (a, b et c) ou par l'isolat DA009 (d, e et f) de *A. grandis*.



Figure 47 Symptômes typiques des *Alternaria* spp. sur les deux hôtes : g) Nécroses sur les feuilles vertes. h) Nécroses entourées d'halos jaunâtres. i & j) Nécrose sous forme de cercles concentriques bien dessinés. k) Propagation de la maladie sur l'ensemble des organes de la plante (feuille, tige et fruit).

Contrairement à certains travaux déjà rapportés sur l'existence d'une agressivité élevée des espèces d'*Alternaria* spp à l'égard de leur hôte respective et l'absence d'une spécialisation particulière (Frazer et Zitter, 2003 ; Martinez et al., 2004 ; Cardoso, 2014 ; Gannibal, 2014 ; Rodrigues et al., 2010), dans notre cas l'agressivité à l'égard des deux plantes hôtes pomme de terre et tomate variait non pas par rapport à l'espèce pathogène (*A. solani*, *A. grandis*, *A. linariae*) mais plutôt variable d'un isolat à l'autre pour chacune de ces 3 espèces pathogènes. Ces espèces ont déjà été signalées en Algérie par Bessadat (2016) et dans le monde notamment en Russie par Gannibal et al. (2012), au Brésil par Rodriguez et al. (2009), en Belgique par Landschoot et al.(2017).

L'existence d'une forte agressivité des *Alternaria* spp. par rapport à leur hôte respectif et l'absence de spécialisation parasitaire ont été rapportées par différents auteurs (Cardoso, 2014 ; Gannibal et al., 2014 ; Rodrigues, 2010). Nos résultats montrent que l'agressivité envers les deux plantes hôtes pomme de terre et tomate ne varie pas en fonction des espèces pathogènes (*A. solani*, *A. grandis*, *A. linariae*) mais plutôt en fonction de l'agressivité des isolats et du niveau de sensibilité ou résistance des variétés utilisées.

Ces comportements sont également en accord avec ceux obtenus *in vitro* par Gilbert et Webbs (2007), et Rodrigues et al. (2006) pour *A. linariae* et *A. grandis* sur tomate et pomme de terre. Rodrigues et al (2010), Gannibal et al (2014) et Woudenberg (2014) ont également signalé les mêmes résultats pour *A. solani* sur pomme de terre et tomate. Nous avons confirmé qu'*A. grandis* est autrefois considéré comme responsable de l'*alternariose* de la pomme de terre et de la tomate en Algérie comme l'a montré Bessadat (2016). La présence de cette dernière espèce est notée dans notre présente étude sur cette culture et dans la région centre du pays et par conséquent donc dans d'autres régions autre que le Nord-Ouest de l'Oranie avec une dispersion à l'échelle du pays.

III.7. Diversité génétique au sein de l'espèce *A. solani* par des marqueurs de type microsatellites

D'après les résultats des études précédentes ayant porté sur les caractères morphologiques, culturels et les facteurs biologiques, il semble y avoir une grande plasticité du génome chez *A. solani*. Afin de savoir si cette capacité d'adaptation est liée à une tendance plus générale au sein de cette espèce à générer du polymorphisme sur son génome, une étude a été initiée pour analyser cette variabilité génétique d'isolats d'*A. solani* isolés de pomme de terre et tomate.

Le polymorphisme chez *A. solani*, a été étudié par l'analyse de la variabilité au niveau des loci microsatellites. Comme rapporté et précisé par la littérature, ces derniers sont constitués de

répétitions en tandem de courts motifs de base de 1 à 6 nucléotides. Ils sont notamment nombreux et largement distribués dans les génomes eucaryotes. Ils sont considérés comme des marqueurs hautement polymorphes de par le nombre de leur répétition et fortement reproductibles. Le tableau 26 représente les résultats d'amplification avec les couples d'amorces des 03 locus microsattellites utilisés.

Durant notre étude nous nous sommes appuyé sur le travail réalisé par Benichou et *al.* (2008) relatif à l'isolement et caractérisation des marqueurs microsattellites du champignon phytopathogène *Alternaria dauci*.

Dans un premier temps 3 locus microsattellites ont été testés sur un échantillonnage de 25 souches représentant 3 espèces proches (*A. solani*, *A. linariae*, *A. protenta*). Aucun polymorphisme n'a été observé au locus Mic 36. Les figures 48 et 49 sont des exemples de gels obtenus pour les deux locus Mic 23 et Mic 127 qui ont présenté un polymorphisme.

Dans un second temps le locus Mic 127 a été retenu pour étudier le polymorphisme intra-spécifique à l'aide d'amorces fluorescentes et d'une séparation par électrophorèse capillaire. Les souches testées sont : DA011, DA014, DA019, DA057, DA090, DA094, DA113, DA114, DA136, DA140, DA141, DA145 de *A. solani* et DA062, DA082, DA086 de *A. protenta*.

Nous précisons qu'en plus des 12 souches de *A. solani* retenues, on a inclus trois souche d'une espèce très proche (*A. protenta*) pour voir si les deux espèces pouvaient partager des allèles communs à ce locus microsattellite.

La calibration spectrale est effectuée une seule fois par série de fluorochromes, avec des standards d'ADN marqués (fig.50). Les tailles des pics majeurs obtenus au locus Mic 127 sur cette collection de souches sont données sur la figure 51 et un exemple de résultat est donné sur la figure 52.

Tableau 26 Résultats des amplifications de l'ensemble des isolats d'*Alternaria* spp. avec les couples d'amorces des 03 locus microsattellites utilisés.

Code 1	Hôte	Lieu d'isolement	Région	Espèce	Microsat (test polymorphisme)					
					Locus Mic23		Locus Mic36		Locus Mic127	
					1	2	3	4	5	6
DA008	PDT	Staouéli	Alger (centre)	<i>A.solani</i>	+	+	-	-	+	+
DA011	PDT	Fouka	Alger (centre)	<i>A.solani</i>	+	+	-	-	+	+
DA014	PDT	Staouéli -ITCMI	Alger (centre)	<i>A.solani</i>	+	+	-	-	+	+
DA019	PDT	Bouira	Bouira (Est)	<i>A.solani</i>	+	-	-	-	+	+
DA025	PDT	Bouira	Bouira (Est)	<i>A.solani</i>	+	-	-	-	+	+
DA050	PDT	Rouina	Ain Defla (Ouest)	<i>A solani</i>	+	+	-	-	+	+
DA057	PDT	Ghris	Mascara (Ouest)	<i>A.solani</i>	+	+	-	-	+	+
DA090	PdT	Mabrouk Jar Ellah	El Oued (Sud)	<i>A solani</i>	+	-	-	-	+	+
DA094	PDT	ENSA-Echantillon2	Alger (centre)	<i>A solani</i>	+	+	-	-	+	+
DA113	Tomate	Bouati Mahmoud	Guelma (Est)	<i>A solani</i>	+	+	-	-	+	+
DA114	PdT	Fedjoudj	Guelma (Est)	<i>A solani</i>	+	+	-	-	+	+
DA136	Tomate	Bouchegroune I	Biskra (Sud)	<i>A solani</i>	+	+	-	-	+	+
DA140	Tomate	Bouchegroune II	Biskra (Sud)	<i>A solani</i>	+	+	-	-	+	+
DA141	Tomate	Laghrou	Biskra (Sud)	<i>A solani</i>	+	+	-	-	+	+
DA145	Tomate	Lichana	Biskra (Sud)	<i>A solani</i>	+	+	-	-	+	+
DA062	Tomate	Stidia	Mostaghanem (Ouest)	<i>A.protenta</i>	+	+	-	-	+	+
DA082	PdT	Ourmes	El Oued (Sud)	<i>A.protenta</i>	+	+	-	-	+	+
DA086	PDT	Sahn Gazel	El Oued (Sud)	<i>A.protenta</i>	+	+	-	-	+	+
CBS	Solanum aviculare		Non connu	<i>A solani</i>	+	+	-	-	+	+
AD134	PDT		Hongrie	<i>A linariae</i>	+	+	-	-	+	+
AD155	PDT		Hongrie	<i>A protenta</i>	+	+	-	-	+	+
AD206	PDT		Hongrie	<i>A solani</i>	+	+	-	-	+	+
AD207	PDT		Hongrie	<i>A linariae</i>	+	+	-	-	+	+
AD208	PDT		Hongrie	<i>A solani</i>	+	+	-	-	+	+
AD232	PDT		Hongrie	<i>A solani</i>	+	+	-	-	+	+

- + Amplification homogène (pas de polymorphisme)
- + Amplification hétérogène (polymorphisme)
- + Amplification légèrement hétérogène (polymorphisme)

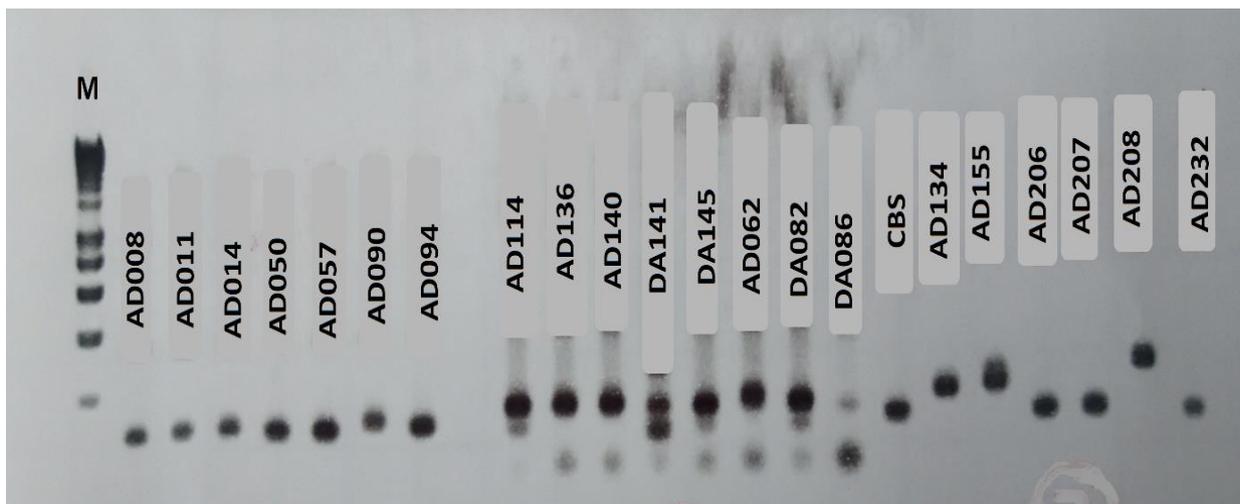


Figure 48 Profil du polymorphisme marqué par le locus Mic 23.

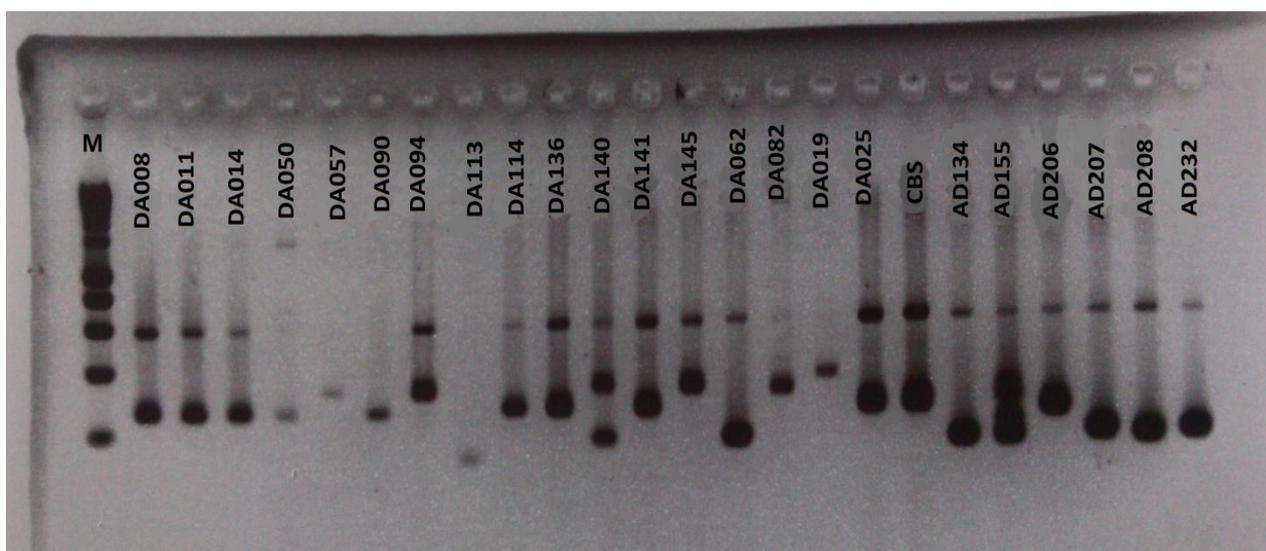


Figure 49 Profil du polymorphisme marqué par le locus Mic 127.

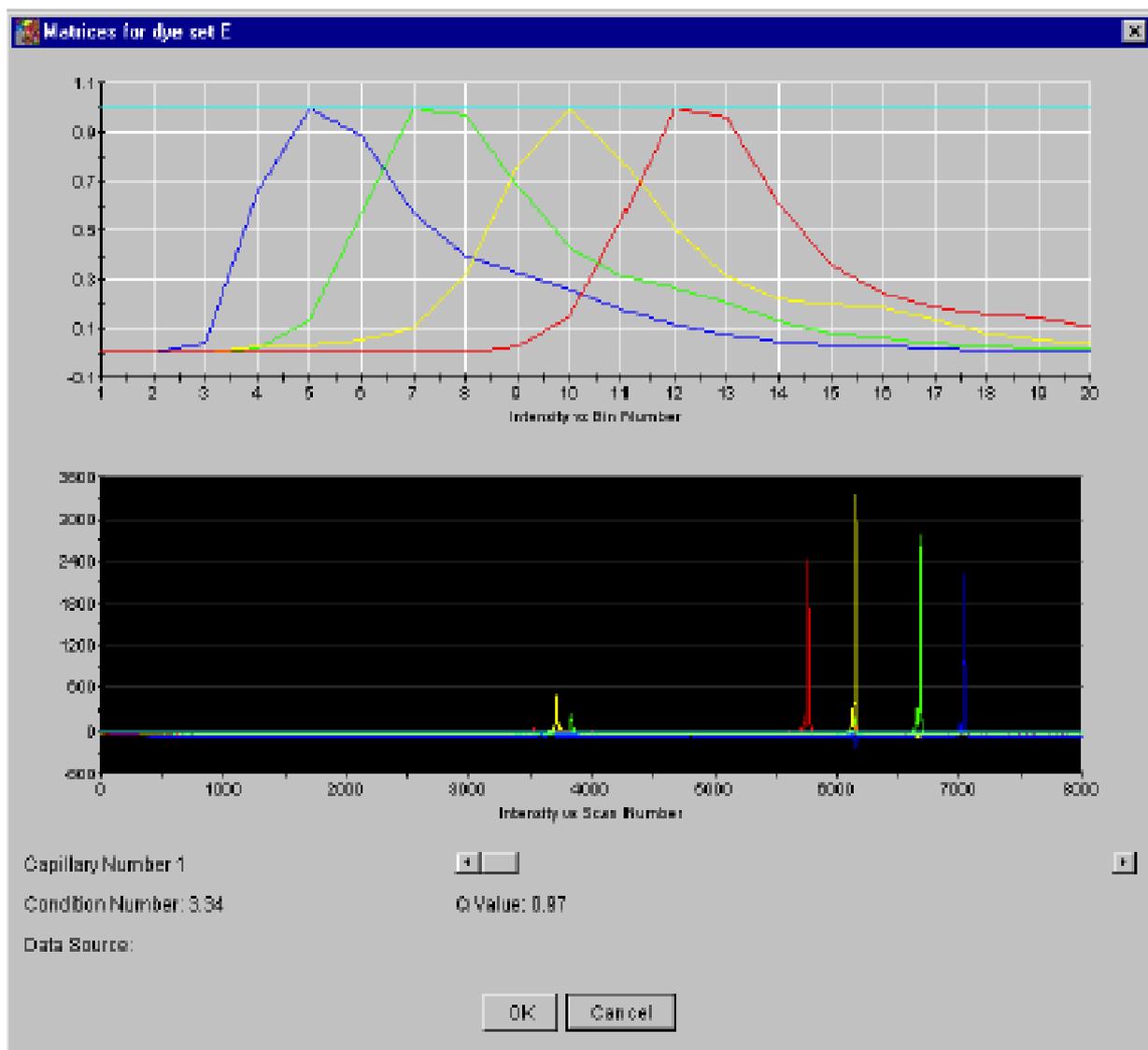


Figure 50 Décomposition spectrale (effectuée sur le capillaire 1) des fluorochromes.

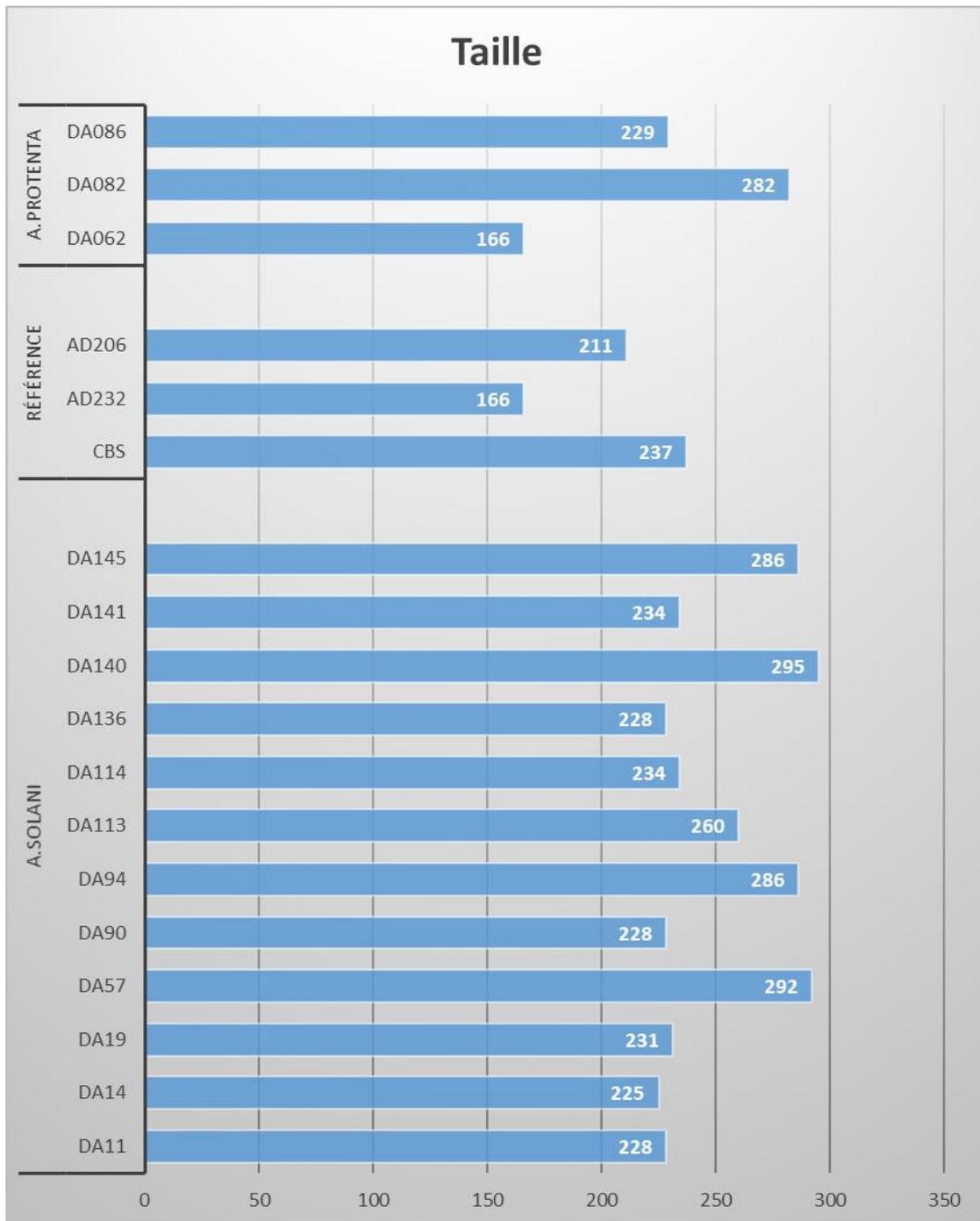


Figure 51 Taille des allèles microsatellites Mic 127 amplifiés à partir des espèces d'*Alternaria solani* et *A. protenta* isolées de pomme de terre et tomate en Algérie comparées à des souches de référence.

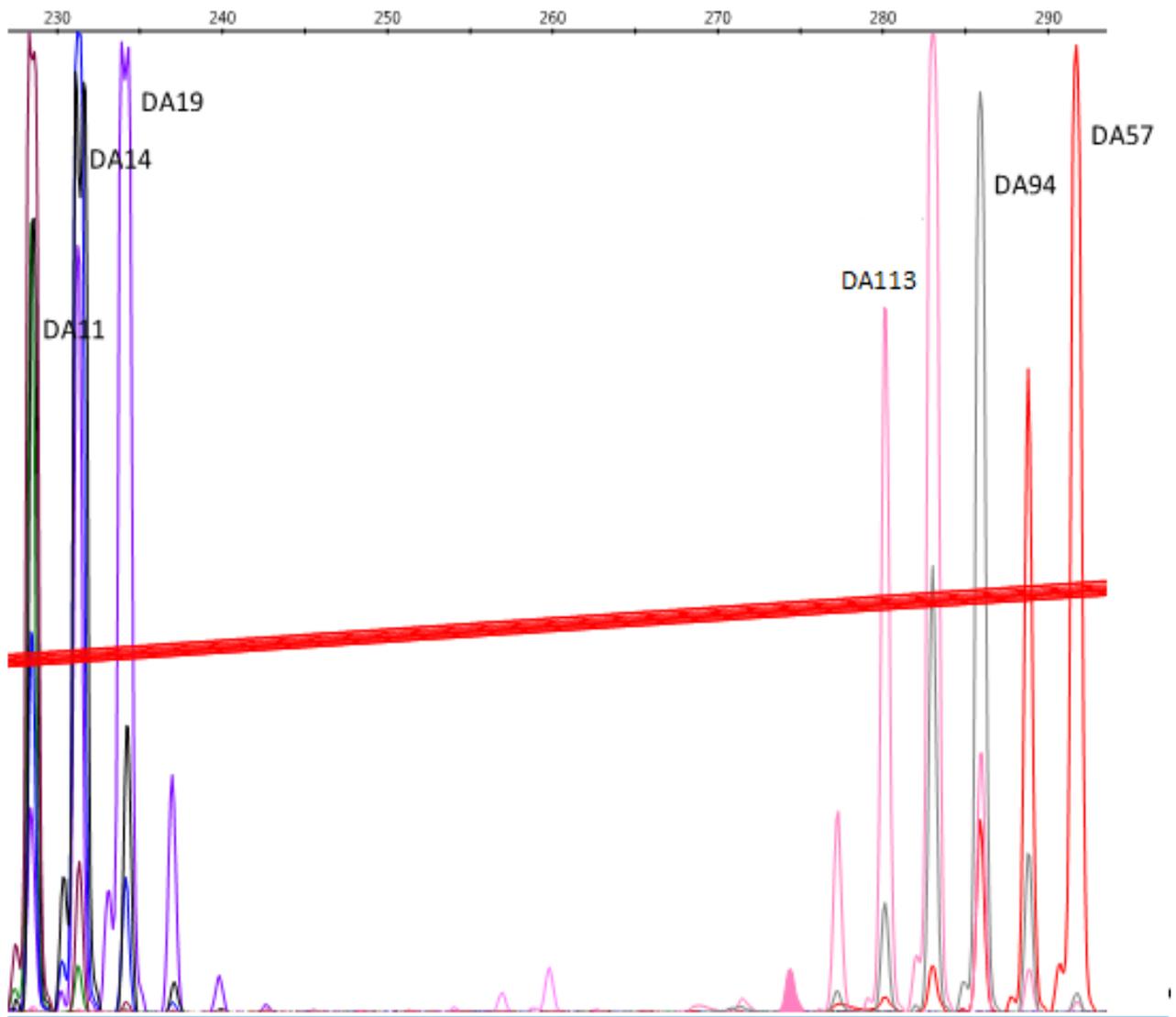


Figure 52 Calibration spectrale des ADN marqués des différents isolats d'*A. solani*.

Les marqueurs moléculaires microsatellites, qui ont été initialement utilisés pour mesurer la diversité génétique des plantes et des animaux (Zietkiewicz et al., 1994), ont également été appliqués dans les études sur les champignons (Hantula et al., 1996, 1998 ; Hantula et Müller, 1997 ; Zhou et al., 1999, 2001).

Chez les champignons, les marqueurs microsatellites, malgré leurs nombreux avantages demeurent encore assez peu utilisés (Lim et al., 2004). Chez *Alternaria solani* en particulier, aucune étude utilisant les microsatellites n'est recensée ; nous avons donc recherché de tels marqueurs dans le génome de cette espèce.

Aucune étude de la diversité génétique sur les populations d'*A. solani* n'a été réalisée en Algérie. Notre étude est un premier essai qui a bien révélé cette diversité clairement démontrée avec des marqueurs microsatellites. Dans d'autres pays comme l'Afrique du Sud, une grande variabilité génétique des populations d'*A. solani* sur de pomme de terre a été signalée suite aux analyses aléatoires par des amplificateurs microsatellites (Van der Waals et al., 2004).

De même, une grande diversité génétique des populations de *A. solani* a été reportée dans plusieurs pays (Petrunak et le Christ 1992 ; Martinez et al., 2004 ; Van der Waals et al., 2004 ; Kumar et al., 2013). Aux Etats-Unis, une grande diversité génétique entre les isolats de pomme de terre et de tomate a été détectée en utilisant des isoenzymes (Petrunak et le Christ 1992) et RAPD (Weir et Huff, 1998) ainsi que des différences significatives entre les isolats des Etats-Unis et d'autres pays (Weir et Huff, 1998).

Plusieurs autres pays comme Cuba, Turquie, Russie, Etats-Unis, et la Grèce ont détectés la diversité génétique des isolats de *A. solani* à l'aide du marqueur AFLP (Martinez et al., 2004). Au Brésil, les études sur la diversité génétique des populations d'*A. solani* ont été commencées dans les années 1990 en utilisant des marqueurs classiques. Une dizaine d'isolats sur pomme de terre et tomate sont comparés sur la base de leur pathogénicité, l'analyse des isoenzymes et des tests de sensibilité aux fongicides (Fancelli, 1991).

Par la suite, la diversité génétique entre les populations d'*A. solani* associée à la pomme de terre et de tomate a été détectée avec des marqueurs RAPD sur les isolats prélevés dans différentes régions au Brésil (Scheuermann et al., 2004). Le marqueur RAPD est couramment utilisé pour recueillir des informations préliminaires sur la variabilité génétique malgré sa faible reproductibilité

(Schlotterer 2004 ; O Gorman et *al.*, 2009). De ce fait, le meilleur moyen pour permettre des déductions fiables, la structure génétique devrait être déterminée en combinant plusieurs marqueurs. RAPD Combiné avec AFLP, un marqueur plus reproductible, plus de régions du génome peuvent être numérisés et une évaluation plus précise de la variation génétique peut être accomplie (Schlotterer, 2004). C'est ce qui a permis d'étudier la diversité génétique au sein et entre les populations d'*A.solani* associés à la pomme de terre et de tomate, échantillonné à partir d'un large éventail géographique au Brésil. Une étude couteuse qui a utilisé à la fois RAPD et marqueurs AFLP.

III.8. Niveaux de résistance des *Alternaria* spp. aux fongicides (azoxystrobine & difenoconazole).

La totalité de la collection de 43 isolats provenant des deux cultures (pomme de terre et tomate), des deux systèmes de cultures (plein champ et sous serre) et des quatre régions géographiques d'Algérie (Est, Ouest, Nord et Sud) a été soumise d'abord au test classique qui est de la mesure de la croissance mycélienne : 13 isolats de *A.linariae*, 11 isolats de *A.grandis*, 15 isolats de *A.solani* et 03 isolats de *A.protenta*. En raison des difficultés pour leur sporulation, seuls, 27 isolats ont été soumis au test de germination des conidies, avec une technique innovante « la néphélométrie » qui s'est réalisée pour la première fois sur les espèces à grandes conidies. Le test a été effectué sur : 01 isolat de *A. linariae*, 10 isolats de *A. grandis*, 12 isolats de *A.solani* et 03 isolats de *A.protenta*.

La sensibilité de ces isolats a été testée *in vitro* par inclusion des fongicides aux milieux de culture. Deux matières actives correspondant à 2 familles différentes ont été testées : les inhibiteurs de quinone extérieur (QoI) qui inhibent la respiration cellulaire en interférant avec la chaîne de transport d'électrons dans les mitochondries : une matière active dont 1 strobilurine (azoxystrobine) et les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols : 1 matière active dont 1 triazole (difenoconazole). L'efficacité de ces molécules, utilisées à des concentrations comprises entre 1, 10 et 100 mg/l, a été testée en notant leurs effets sur la croissance mycélienne et la germination des spores. Les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne par rapport à un témoin ont été calculés et la sensibilité de chaque isolat a été ensuite estimée par le calcul des CI50 (concentration inhibant la croissance de 50%) correspondantes.

Les résultats obtenus ont montré une bonne efficacité des composés strobilurines sur toutes les espèces. Pour les triazoles, une bonne efficacité générale est également obtenue. L'azoxystrobine apparaît toujours plus efficace que le difenoconazole pour le test de la croissance mycélienne et la germination des spores. Cependant, deux souches d'*A. linariae* et *A. grandis* (DA153 et DA047)

ont montré une multi-résistance à azoxystrobine et difénoconazole pour le test de la néphélométrie qu'on a testé pour la première fois sur *A. solani* afin de suivre et mesurer la vitesse de la germination des spores. Une technique innovante dans le but de compléter voir confirmer les résultats de la vitesse de croissance mycélienne qui se réalise traditionnellement.

III.8.1. Etude sur les effets d'azoxystrobine et difénoconazole chez les *Alternaria* spp.

III.8.1.1. Effets sur la croissance mycélienne des *Alternaria* spp.

L'utilisation massive des fongicides de famille des strobilurine et triazole en Algérie nous a conduit à tester la sensibilité à ces familles de fongicides sur un échantillonnage d'isolats de plusieurs espèces à grandes spores identifiées sur pomme de terre et tomate. Le principe est d'analyser les effets des molécules d'Azoxystrobine et de difénoconazole sur la croissance mycélienne, à des concentrations comprises entre 1 et 100 mg/L. Ainsi, 15 souches d'*A. solani*, 13 souches d'*A. linariae*, 11 souches d'*A. grandis* et 03 souches d'*A. protenta* ont été testées. Le niveau de sensibilité et résistance de tous les isolats a été déterminé par le calcul de la CI50 moyenne (Tableau 27).

La figure 53 représente les niveaux de résistance pour l'azoxystrobine (Amistar) et le difénoconazole (Score) pour l'ensemble des isolats des 04 espèces étudiées. Nous constatons d'après l'analyse de nos résultats, quatre niveaux de résistance variant de hautement sensible (HS), sensible (S), légèrement résistant (LR) à moyennement résistant (MR) sans aucun enregistrement de souches hautement résistantes (HR) et cela pour tous les isolats sur les deux fongicides.

La distribution des niveaux de résistance se traduit par deux à trois types de souches, de sensible, légèrement résistante à moyennement résistante selon les espèces. Concernant le difénoconazole (score), *A. linariae* présente 61.63 % de souches sensibles (S) avec une valeur de CI50 moyenne de 1.30 mg/L ; 30.76 % de souches légèrement résistantes (LR) avec une valeur de CI50 moyenne de 7.63 mg/L et une seule souche (DA101) qui s'est avérée moyennement résistante (MR) avec la valeur de CI50 moyenne de 33.95 mg/l. *A. grandis* présente 72.72% de souches légèrement résistantes (LR) avec une valeur de CI50 moyenne de 7.12 mg/L contre 18.18% de souches sensibles avec une valeur de CI50 moyenne de 1 mg/L et une seule souche (DA155) qui s'est montré moyennement résistante (MR) avec une valeur de CI50 moyenne de 32.95mg/l.

Tableau 27 Les différents niveaux de résistance des isolats d'*Alternaria* spp. vis-à-vis des fongicides (Score et Amistar Syn. azoxystrobine et difénoconazole).

Espèce	Code	NR	
		Score	Amistar
<i>A.linariae</i>	DA001	LR	S
	DA002	S	LR
	DA003	S	LR
	DA006	LR	LR
	DA007	S	S
	DA040	S	S
	DA100	LR	LR
	DA101	MR	S
	DA109	S	HS
	DA111	S	S
	DA119	S	LR
	DA147	LR	S
	DA153	S	LR
<i>A.grandis</i>	DA009	S	S
	DA038	LR	S
	DA047	LR	LR
	DA052	S	HS
	DA054	LR	LR
	DA060	LR	LR
	DA099	LR	S
	DA152	LR	LR
	DA154	LR	S
	DA155	MR	LR
DA156	LR	S	
<i>A.solani</i>	DA008	S	S
	DA011	LR	S
	DA014	LR	MR
	DA019	S	S
	DA025	S	S
	DA050	LR	S
	DA057	S	S
	DA090	S	S
	DA094	LR	LR
	DA113	S	S
	DA114	S	S
	DA136	S	LR
	DA140	S	S
	DA141	S	S
DA145	S	S	
<i>A.protenta</i>	DA062	S	S
	DA082	LR	S
	DA086	LR	S

A. solani présente le type des souches sensibles (S) à 73.33 % avec une valeur de CI50 moyenne de 1.17 mg/L contre 26.66 % de souches légèrement résistantes (LR) avec une valeur de CI50 moyenne de 4 mg/L. *A. protenta* présente 66.66 % de souches légèrement résistantes (LR) avec des valeurs ne dépassant pas 4.02 mg/l contre une seule souche sensible (S) avec la valeur de CI50 moyenne de 1mg/l. De ce fait, nous constatons que concernant la réponse des *Alternaria* spp à l'égard de difénoconazole, la majorité des souches sont sensibles pour les espèces *A. linariae* et *A. solani* ou bien légèrement résistantes pour les espèces *A. grandis* et *A. protenta*.

Concernant l'azoxystroblin (Amistar), *A. linariae* présente le même pourcentage (46.15 %) des souches sensibles (S) avec des valeurs de CI50 moyenne ne dépassant pas 1.54 mg/l et des souches légèrement résistantes (LR) avec des valeurs de CI50 moyenne 6.90 mg/l et une seule souche (DA109) hautement sensible (HS) ; *A. grandis* présente aussi le même pourcentage (45.45 %) des souches sensibles (S) avec des valeurs de CI50 moyenne ne dépassant pas 1.36 mg/l et légèrement résistantes (LR) avec des valeurs de CI50 moyennes de 11.08 mg/l et une seule souche hautement sensible (HS) avec la valeur de CI50 moyenne de 0.47 mg/l .

A. solani présente 80 % des souches sensibles (S) avec des valeurs de CI50 moyenne de 2.12 mg/l contre deux souches (DA094 et DA136) légèrement résistantes et une seule souche (DA014) qui s'est montrée moyennement résistante avec une valeur de CI50 moyenne de 80.75 mg/l. *A. protenta* s'est avérée à 100 % sensible (S) avec des valeurs de CI50 moyenne ne dépassant pas 1.41 mg/l. De ce fait, nous concluons concernant la réponse des *Alternaria* spp à l'égard de l'azoxystrobine que les souches des 4 espèces sont majoritairement soit sensibles soit légèrement résistantes.

Nous constatons que l'effet des deux fongicides est donc différent sur l'ensemble des isolats des 04 espèces testées (Fig.54). Sensible, légèrement résistant à moyennement résistant à l'égard du difénoconazole et sensible à légèrement résistant à l'égard de l'azoxystrobine (Figs. 55, 56, 57, 58, 59 et 60). Il semble que le SHAM associé à l'azoxystrobine favorise le control de la croissance mycélienne suite à son effet de blocage de toute voie de respiration alternative du pathogène.

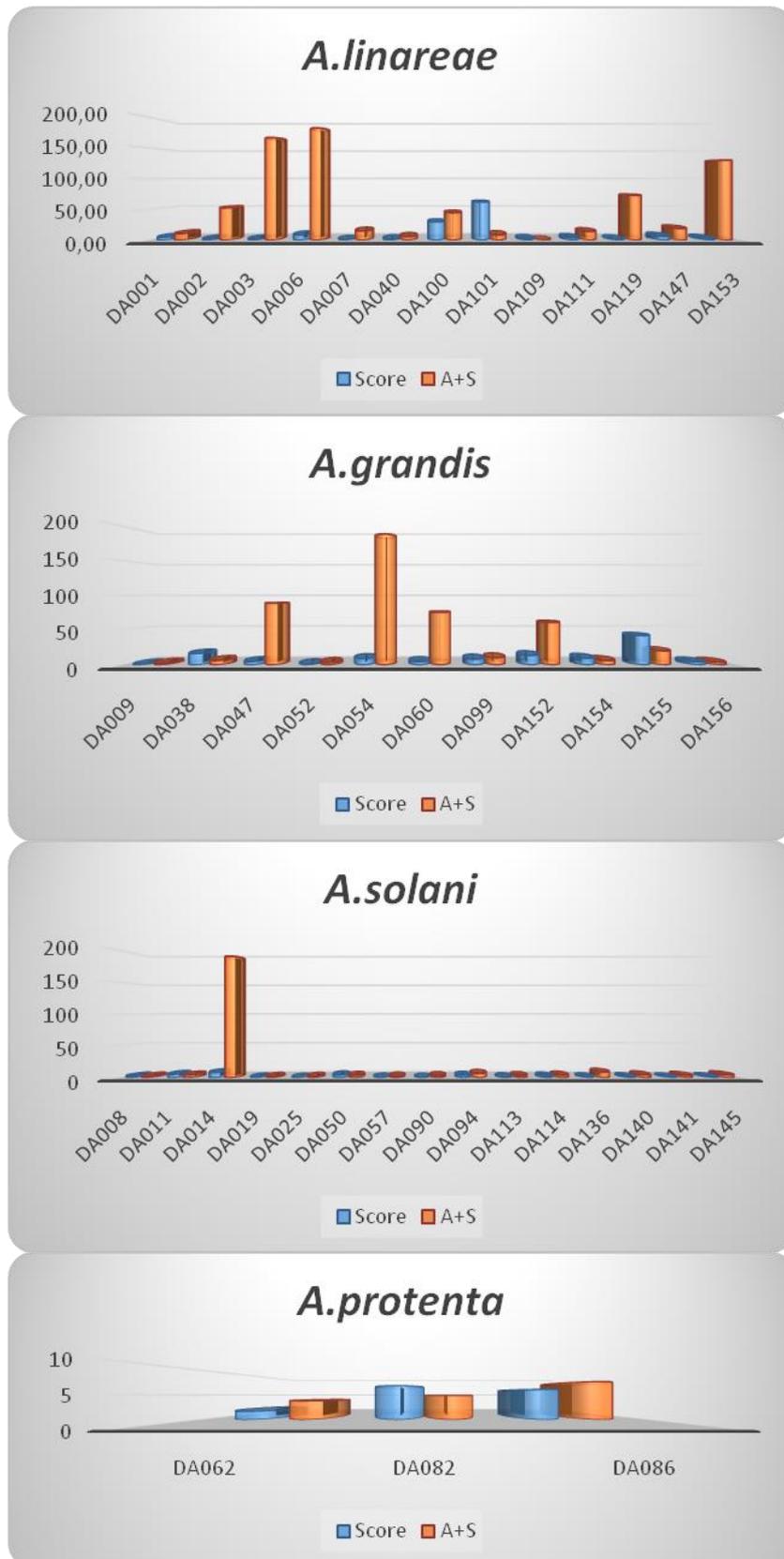


Figure 53 Niveaux de résistance des 04 espèces à l'égard de l'azoxystrobine (A) et le difénoconazole (S).

III.8.1.2 Effets sur la germination des spores et l'élongation des tubes germinatifs des *Alternaria* spp.

L'effet d'azoxystrobine et difénoconazole a été complété par une étude sur la germination des spores notamment par la technique de la néphélométrie et l'élongation des tubes germinatifs de 26 isolats d'*Alternaria* spp. qui ont sporulés (Fig.61).

Selon le cas, en absence (conidies traitées à l'eau) ou en présence des différents fongicides (1, 10 et 100 mg/l), les taux de germination des spores et les effets inhibiteurs sur l'élongation des tubes germinatifs ont été déterminés en calculant leur pourcentage d'inhibition par rapport au témoin, et en estimant la CI 50 moyenne. Pour une étude complémentaire à celle effectuée sur la croissance mycélienne, le test sur la germination des spores et l'élongation des tubes germinatifs a été réalisé uniquement sur les souches qui ont sporulées.

Les résultats des deux tests notamment la mesure des tubes germinatifs et la vitesse de germination des spores (tableau 28) montrent une nette différence dans la réponse de l'ensemble des isolats utilisés. La technique de la néphélométrie nous montre clairement le caractère de multi-résistance, en particulier DA153 et DA047 par rapport à la vitesse de la germination de leurs conidies qui semble peu ou pas affectées par les fongicides testés. Pour le test de la mesure de l'élongation des tubes germinatif, l'ensemble des isolats, se sont montrés légèrement résistantes (LR). Néanmoins, la vitesse de la germination des spores par la néphélométrie de certains isolats étant fortement inhibée par les deux fongicides par rapport à l'élongation des tubes germinatifs ainsi qu'à la croissance mycélienne.

Il est à noter que, la présence du SHAM dans l'azoxystrobine semble favoriser l'effet de ce dernier sur les 03 principales espèces *A. linariae*, *A. grandis* et *A.solani* confirmant ainsi les résultats de la croissance mycélienne que l'azoxystrobine a plus d'effet que le difénoconazole

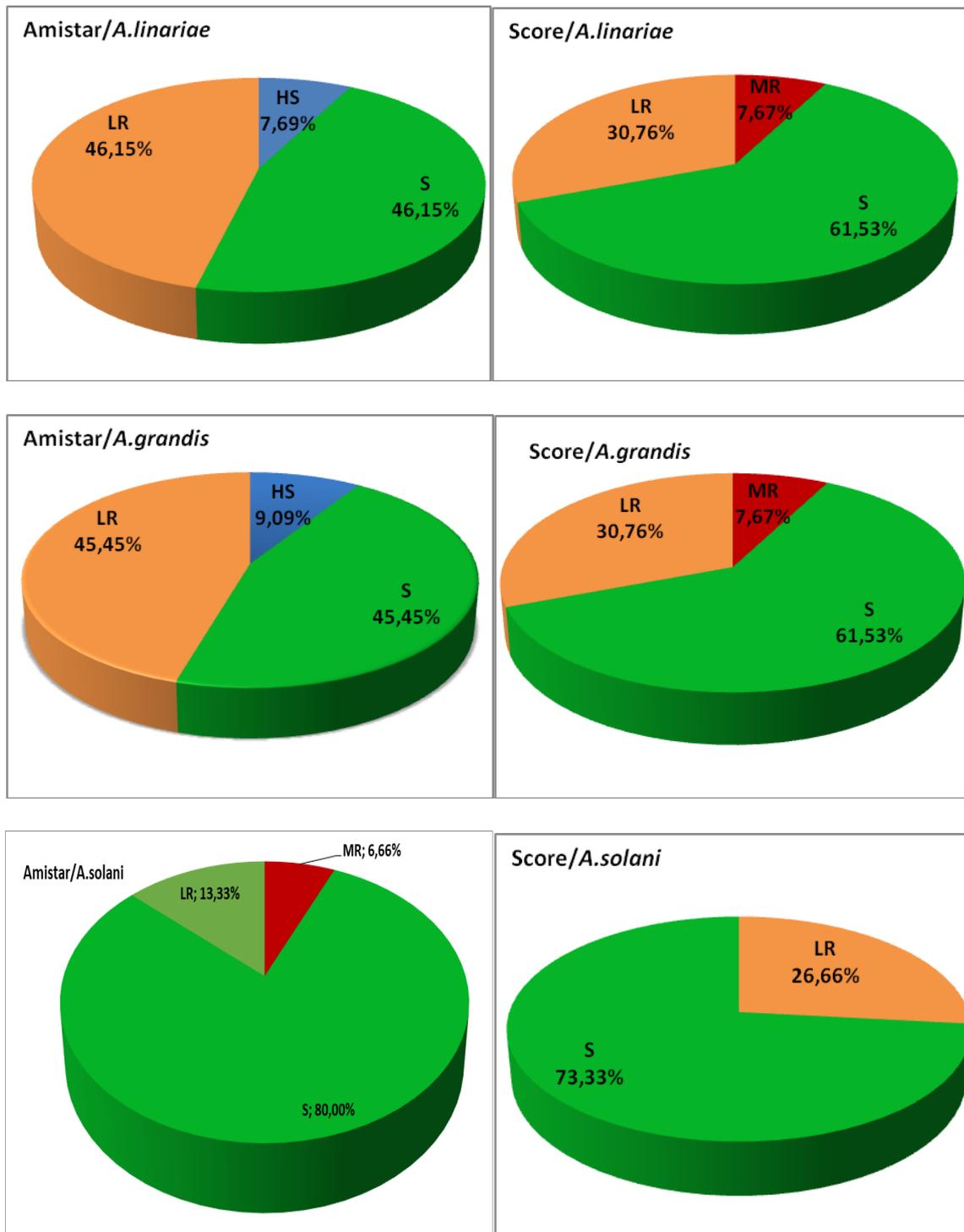


Figure 54 : Niveau de résistance des trois principales espèces d'*Alternaria* (*A.linariae*, *A.grandis* et *A.solani*) à l'égard des deux fongicides (Amistar + score).

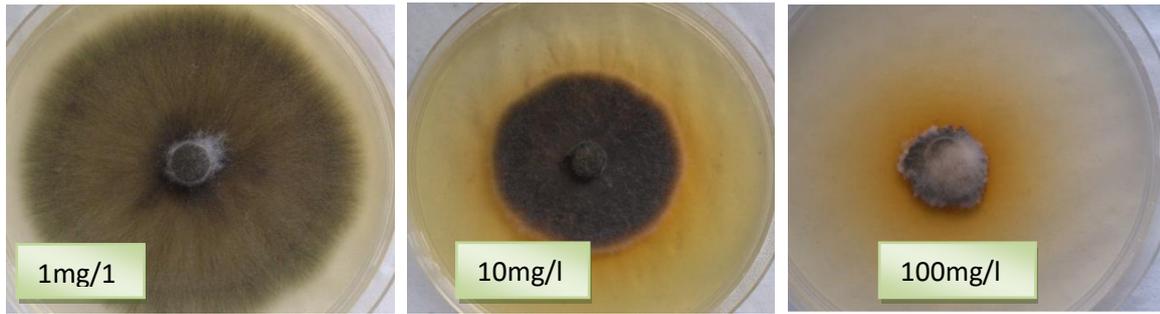


Figure 55 Croissance mycélienne de la souche légèrement résistante (DA094) sur le milieu modifié par le fongicide Azoxystrobine à 20 jours d'incubation à des doses respectives de 1, 10 et 100 mg/l.

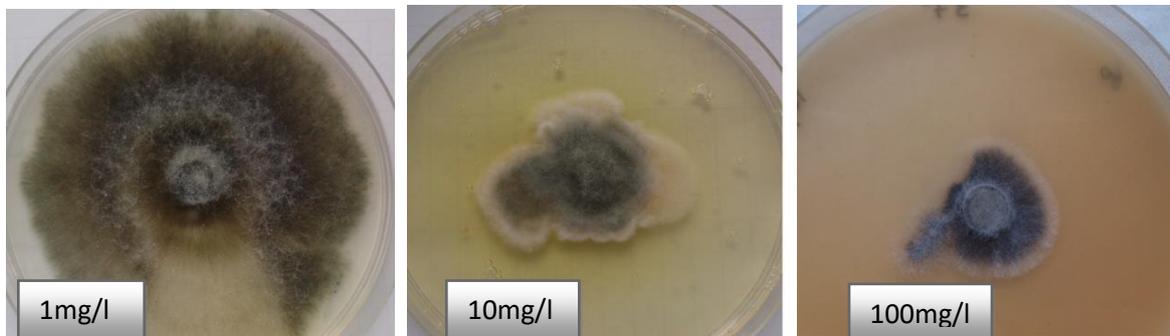


Figure 56 Croissance mycélienne de la souche légèrement résistante (DA094) sur le milieu modifié par le fongicide difénoconazole à 20 jours d'incubation à des doses respectives de 1, 10 et 100 mg/l.

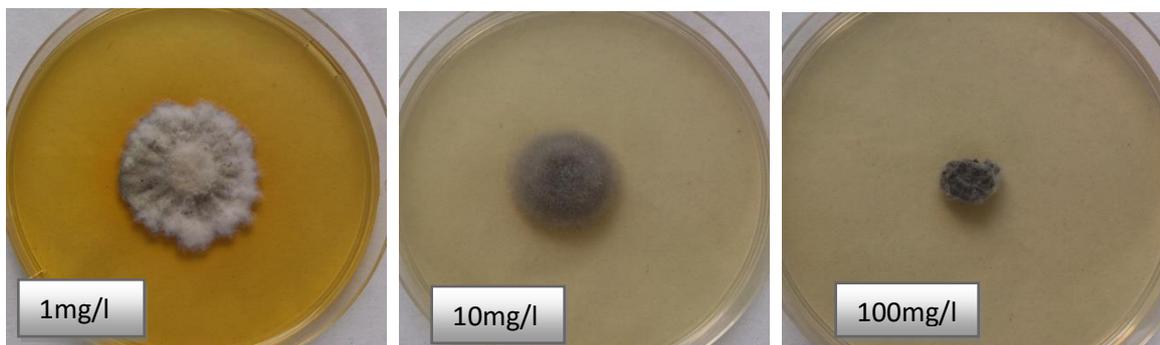


Figure 57 Croissance mycélienne de la souche sensible (DA008) sur le milieu modifié par le fongicide Azoxystrobine à 20 jours d'incubation à des doses respectives de 1, 10 et 100 mg/l.



Figure 58 Croissance mycélienne de la souche sensible (DA008) sur le milieu modifié par le fongicide difénoconazole à 20 jours d'incubation à des doses respectives de 1, 10 et 100mg/l.

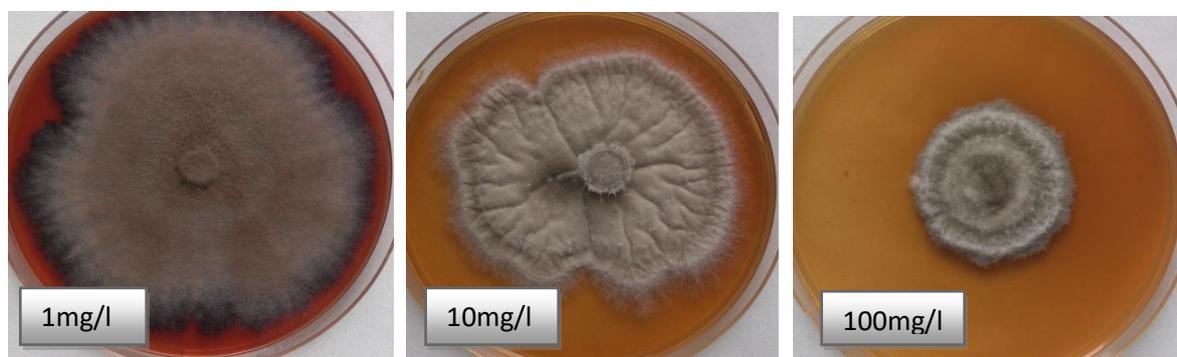


Figure 59 Croissance mycélienne de la souche moyennement résistante (DA014) sur le milieu modifié par le fongicide Azoxystrobine à 20 jours d'incubation à des doses respectives de 1, 10 et 100 mg/l.

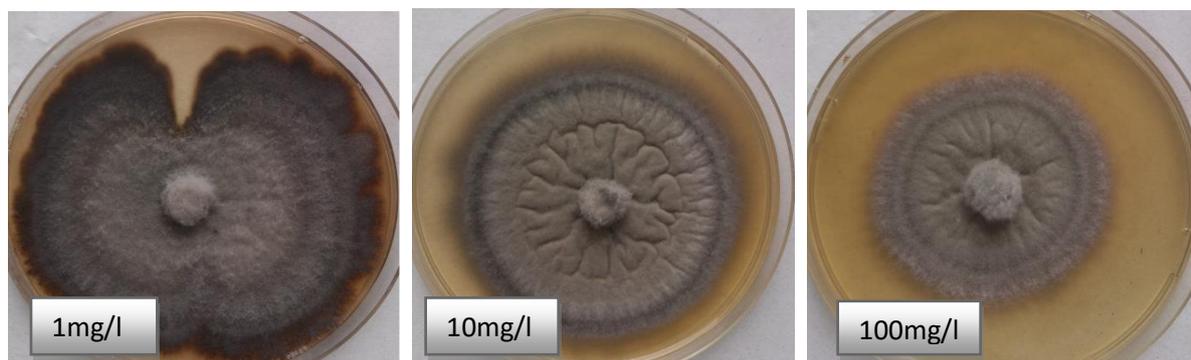


Figure 60 Croissance mycélienne de la moyennement résistante (DA101) sur le milieu modifié par le fongicide difénoconazole à 20 jours d'incubation à des doses respectives de 1, 10 et 100 mg/l.

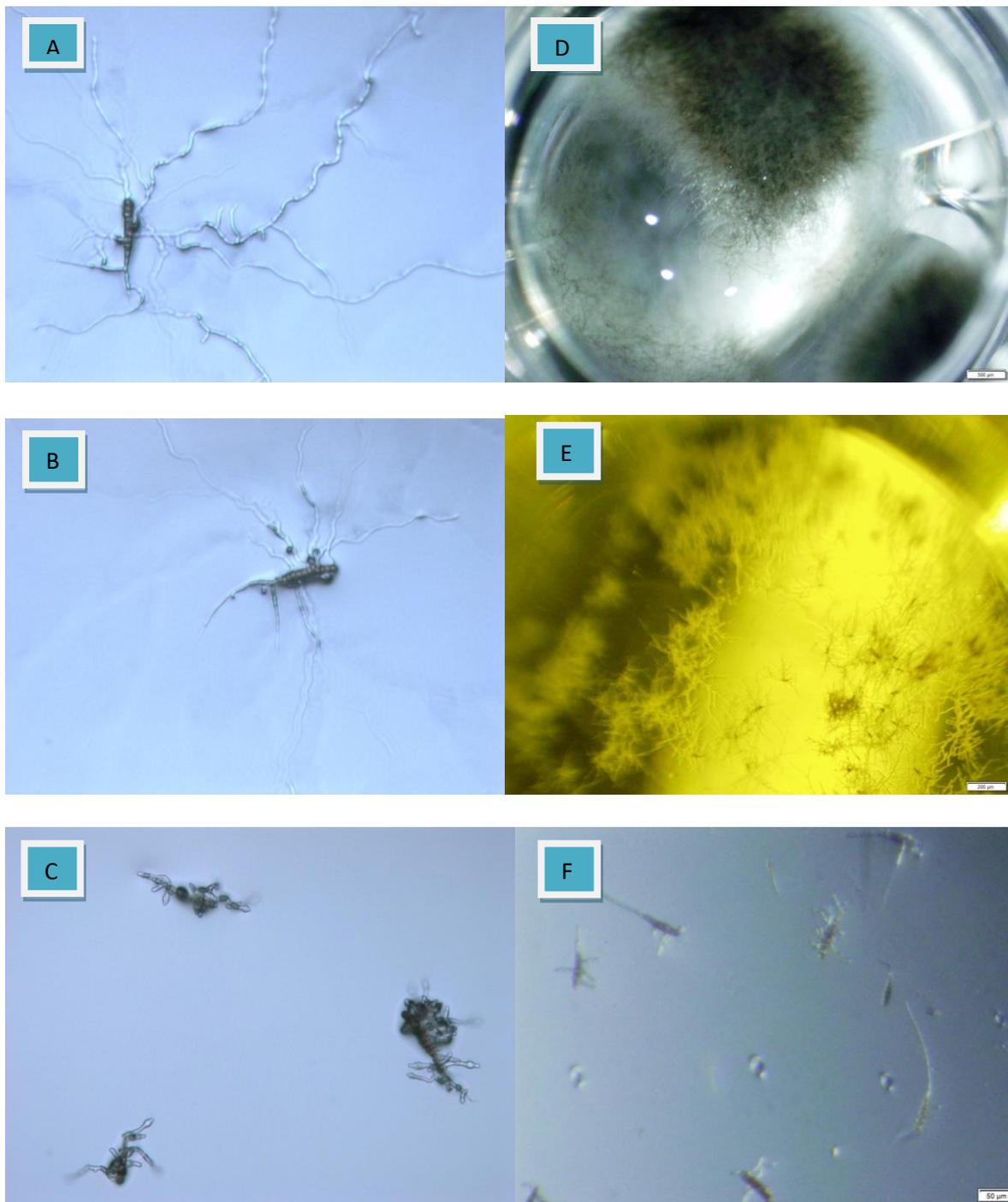


Figure 61 Effet des fongicides (azoxystrobine et difénoconazole) sur la germination des spores :

- Technique classique (A, B, C respectivement 1, 10, 100mg/l)
- Technique néphélobimétrie (D, E, F respectivement 1, 10, 100mg/l)

Tableau 28 Niveaux de résistance des *Alternaria* spp pour la germination des spores et l'élongation des tubes germinatifs.

Espèce	Isolat	Score		Amistar	
		Germ.spores	Nephelo	Germ.spores	Nephelo
<i>A.linariae</i>	DA153	MR	MR	LR	HR
<i>A.grandis</i>	DA009	LR	HS	LR	MR
	DA038	LR	S	LR	LR
	DA047	LR	HR	LR	HR
	DA052	LR	S	LR	S
	DA060	LR	LR	LR	HR
	DA099	LR	LR	LR	LR
	DA152	LR	S	LR	LR
	DA154	LR	LR	LR	MR
	DA155	LR	LR	LR	LR
	DA156	LR	LR	LR	LR
<i>A.solani</i>	DA008	LR	HS	LR	MR
	DA014	LR	LR	LR	S
	DA019	LR	HS	LR	MR
	DA025	LR	S	MR	LR
	DA057	MR	S	LR	HS
	DA090	LR	S	LR	S
	DA094	LR	LR	LR	LR
	DA113	LR	LR	LR	LR
	DA114	LR	LR	LR	HS
	DA140	LR	LR	LR	LR
	DA141	LR	LR	LR	LR
	DA145	LR	LR	LR	LR
<i>A.protenta</i>	DA062	LR	LR	LR	S
	DA082	LR	LR	LR	LR
	DA086	LR	LR	LR	LR

La sensibilité de la croissance mycélienne des isolats d'*Alternaria* spp à l'azoxystrobine est compatible à la sensibilité de la germination de leurs spores. Les tests de germination des spores devraient être le moyen privilégié de résistance in vitro en raison de l'inhibition possible de la croissance mycélienne par SHAM (Tymon, 2014). Cependant, SHAM a un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne d'*A. alternata* isolée des agrumes sur le milieu modifié avec l'azoxystrobine. La sensibilité d'*A. alternata* aux fongicides n'a pas été altérée par l'addition de SHAM (Mondal et al., 2002). Ce dernier inhibe efficacement l'utilisation d'une voie alternative de

respiration cellulaire lorsque le transport d'électrons de bloc QoIs entre cytochrome b et c. Cette voie est active sur un milieu artificiel (Mondal et *al.*, 2002).

Un champignon pathogène c'est avant tout un organisme qui, durant son cycle de développement, est en constante interaction avec son environnement (plante, complexe parasitaire, climat, etc.). Le placer dans un contexte artificiel de laboratoire, c'est n'obtenir que des réponses partielles aux questions pratiques que nous nous posons !

L'expérience de ces dernières années nous montre que l'*Alternaria* responsable de early blight sait apparaître inopinément et que sa prédiction précise n'est pas facile. Une certitude est que la lutte ne sera satisfaisante que si elle est préventive. Après les dégâts de 2010 et surtout de 2011 (Syngenta, 2013), l'agriculteur demande un programme précis et performant.

D'après nos résultats de cette étude, différents pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne pour les 04 espèces ont été observés en réponse aux différentes concentrations testées pour l'azoxystrobine et le difénoconazole. La plupart des isolats des 04 espèces se sont avérés sensibles aux deux fongicides avec certains isolats présentant une résistance modérée à l'azoxystrobine et à difénoconazole. Deux (4.65%) isolats testés ont présenté une résistance modérée (MR) au difénoconazole, alors que seulement un (2.32 %) isolat a présenté une résistance modérée à l'azoxystrobine. 19 (44.18%) isolats ont présenté une résistance légère (LR) au difénoconazole, alors que seulement 14 (32.55 %) isolats ont présenté une résistance légère à l'azoxystrobine.

L'utilisation des strobilurines, pour lesquelles une réelle efficacité a été démontrée pour le contrôle de maladies de type *Alternarioses* (Reuveni and Sheglov, 2002), peut être envisagée. Cependant, bien que d'une utilisation récente, l'efficacité des strobilurines semble dans de nombreux cas d'études, y compris le notre, compromise par l'apparition de souches résistantes. La résistance peut se propager rapidement à travers une région en particulier lorsque les fongicides avec le même mode d'action sont appliqués répétitivement (Tymon, 2014). La résistance aux fongicides QoI chez *Blumeria graminis* a été découverte dans le blé deux ans seulement après leur utilisation initiale (Rosenzweig et *al.*, 2008).

D'après nos résultats, 22 (51.16 %) isolats ont présenté une sensibilité (S) au difénoconazole, alors que 26 (60.46 %) isolats ont présenté une sensibilité à l'azoxystrobine. Aucun (0%) isolat n'a présenté une haute sensibilité (HS) au difénoconazole, alors que deux (4.65 %) isolats ont présenté une haute sensibilité à l'azoxystrobine.

La résistance à l'azoxystrobine a été détectée dans les populations de *A. solani* sur la pomme de terre dans le Midwest (Birnboim, 1983 ; Berto et *al.*, 1997) et dans le sud de l'Idaho (Andrade et *al.*, 2000). La résistance d'*A.alternata* à l'azoxystrobine a été rapportée sur le pistache en Californie (Agarwal et Sinclair, 1997, Aradhya et *al.*, 2001) et dans le sud de l'Idaho (Andrade et *al.*, 2000). Cette perte d'efficacité résulte de la sélection de populations résistantes à l'azoxystrobine. La résistance de ces souches est corrélée à une mutation ponctuelle en position 143, dans le gène *cyt b* codant pour le cytochrome b, cible des strobilurines (Ma et *al.*, 2003). De même des souches résistantes aux strobilurines ont été détectées chez *Alternaria mali* et *Alternaria solani*, et elles portent également une mutation ponctuelle dans le gène *cyt b* en position 143 (Lu et *al.*, 2003 ; Pasche et *al.*, 2002). En Algérie, en dehors de notre étude, aucune des études antérieures n'ont été réalisées sur la résistance aux fongicides.

La vitesse à laquelle se développe la résistance aux fongicides dans une population est basée sur trois critères: la fréquence initiale des isolats résistants, les taux de traitement fongicide des isolats résistants et sensibles, et le taux d'infection des isolats résistants par rapport aux isolats sensibles (Miyamoto et *al.*, 2010). Le taux potentiel auquel la résistance à l'azoxystrobine et au difénoconazole pourraient se développer dans les quatre espèces d'*Alternaria* est élevé en Algérie parce que les trois facteurs sont applicables aux quatre populations. Même si la fréquence des isolats résistants peut être initialement modérée, des applications répétées de l'azoxystrobine et difénoconazole pourrait sélectionner des génotypes résistants. Les espèces d'*Alternaria* produisent un grand nombre de conidies pendant toute la saison de croissance, ce qui augmente de façon exponentielle la fréquence des isolats résistants. Les conidies des espèces *Alternaria* sont dispersées par le vent et l'inoculum d'isolats résistants peut être diffusé sur différentes distances (Bashan et *al.*, 1991).

La résistance aux fongicides est sélectionnée par l'utilisation de fongicides à spectre étroit ou en alternance avec des fongicides à large spectre. Dans notre étude, les isolats légèrement résistants à l'azoxystrobine ou au difénoconazole ont certainement été recueillis à partir des champs qui ont été traités régulièrement avec ces deux fongicides. Cela indique que les isolats résistants peuvent être initialement présents dans les populations à basses fréquences. Cela a également été observé dans les populations d'*A.alternata* sur le pistachier (Avenot et Michailides, 2007). Tymon (2014) a rapporté que la résistance d'*A. solani* à l'azoxystrobine se développe lentement.

Pour résumer le cas de notre étude, la germination des spores des quatre espèces d'*Alternaria* a différents seuils de concentration a été moins affectée que la croissance mycélienne par

l'azoxystrobine et difénoconazole. Le taux de germination des spores des quatre espèces à une concentration de seuil était proportionnellement plus important que les taux de croissance mycélienne. Ces résultats ont également été observés à des concentrations plus élevées de matière active pour les fongicides. Les résultats du rapport de croissance mycélienne sont semblables à celles de la germination des spores pour les plus faibles concentrations de 1 mg/l à 10 mg/l d'azoxystrobine et de difénoconazole. Ceci indique que ces faibles concentrations de fongicides ne sont pas efficaces pour réduire l'infection et la colonisation par l'agent pathogène et qu'un minimum de 100 mg/l d'azoxystrobine et de difénoconazole sont nécessaires pour le control de la maladie.

Le test de la germination des spores devrait être le premier dosage dans l'évaluation des taux effectifs nécessaires pour la maîtrise de la maladie puisque l'inhibition de la germination des spores est la première étape pour éviter une épidémie. La présence de la résistance aux fongicides en Algérie menace les protocoles de gestion actuels et dicte la nécessité d'améliorer les méthodes de contrôle et de prévention.

**CONCLUSION GENERALE
&
PERSPECTIVES**



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Bessadat, (2014) qui estime l'incidence de l'*alternariose* à 79,63% (prévalence) uniquement sur l'ouest du pays. Nos prospections réalisées entre 2012 et 2015 sur l'ensemble du pays ont montré la présence d'*Alternaria* spp. en particulier les grandes conidies, difficiles à isoler par rapport aux petites conidies, dans les grands et petits points causés par l'*alternariose*. Les espèces d'*Alternaria* à grandes conidies associées à l'*alternariose* de la pomme de terre et de la tomate en Algérie ont été inventoriées selon la taxonomie classique et moderne. *A. solani*, *A. linariae*, *A. grandis* et *A. protenta* sont les espèces communes sur pomme de terre et tomate. Une nouvelle espèce, *A. protenta* a été trouvée sur pomme de terre et tomate pour la première fois en Algérie et dans le monde pour tomate. La différenciation entre les quatre espèces : *A. solani*, *A. linariae*, *A. grandis* et *A. protenta* a été étudiée par une caractérisation morphologique et confirmée par des marqueurs moléculaires spécifiques et séquençage de deux loci: les gènes calmoduline et RPB2.

La caractérisation morphologique reste insuffisante pour distinguer les *Alternaria* spp. à grandes spores; des outils moléculaires sont nécessaires pour cela. Avec le groupe d'espèces *Alternaria alternata*, *A. solani* est l'espèce à grandes conidies la plus commune sur pomme de terre et tomate ; cependant, d'autres espèces avec de grandes conidies comme *A. linariae*, *A. grandis* et *A. protenta* peuvent également infecter la pomme de terre et la tomate en plein champ dans toutes les zones de culture d'Algérie. Néanmoins, nous précisons que les deux espèces *A. solani* et *A. linariae* sont les plus communes sur respectivement pomme de terre et tomate dans toute les zones de culture de pomme de terre et de tomate en Algérie. *A. protenta* et *A. linariae* ont été identifiés sur pomme de terre pour la première fois en Algérie et sont pathogènes sur cette culture. Ce présent travail de recherche remet donc en question la spécificité parasitaire et montre qu'*A. linariae* n'est pas spécifique de la tomate comme indiqué précédemment dans la littérature ; il a été isolé de la pomme de terre pour la première fois en Algérie dans des conditions de plein champs. *A. linariae* ne peut pas être considéré comme spécifique de la tomate comme indiqué dans la littérature, car plusieurs isolats à partir de la pomme de terre sont obtenus pour la première fois dans le monde. *A. grandis* n'est pas non plus spécifique à la pomme de terre, puisqu'isolée également de la pomme de terre.

De plus, nos résultats obtenus par inoculation artificielle croisée indiquent que *A. linariae* n'est pas spécifique à la tomate, puisqu'il a été isolé dans des conditions de terrain sur pomme de

terre pour la première fois en Algérie et probablement dans d'autres pays du monde. *A. grandis* n'est pas non plus spécifique à la pomme de terre. De ce fait, nos résultats permettent de confirmer l'absence de spécialisation parasitaire des trois pathogènes par rapport à leurs deux hôtes : la pomme de terre et la tomate.

Nos résultats obtenus au cours des trois campagnes agricoles montrent une large répartition des espèces d'*Alternaria* avec de grandes conidies dans toutes les zones de production de pommes de terre et de tomates des différentes zones bioclimatiques. Dans nos résultats, les isolats avec de petites conidies ont été obtenus à partir de nécroses comme celles dont les isolats avec de grandes conidies ont été isolés. Nous avons également noté l'absence de corrélation entre la présence de l'halo jaune autour de la nécrose et la présence de pigments dans le milieu de culture et même s'ils sont présents, ils sont de couleurs différentes. La sporulation des espèces *Alternaria* avec de grandes conidies sur milieu de culture diffère selon les isolats. En général, les isolats d'*A. solani* étaient beaucoup plus sporulés que ceux d'*A. linariae*, mais ils sporulent mieux lorsqu'ils sont isolés sur tomate. La faible sporulation des grandes conidies *Alternaria* confirme les difficultés rencontrées par les différents auteurs pour sporuler ces espèces surtout après des sous-cultures répétées et les oblige à expérimenter les différents facteurs (lumière, température, milieux de culture) qui pourraient favoriser la sporulation.

La diversité génétique a eu une petite attention durant nos travaux de recherche, car nous avons tenté de vérifier la façon dont la variation génétique est répartie dans l'espace et si la variation génétique est liée à l'origine géographique des isolats en utilisant des marqueurs microsatellites. Le résultat est encourageant pour une enquête élargie afin de quantifier la quantité de variation génétique dans la population de *A. solani* et sa distribution en Algérie.

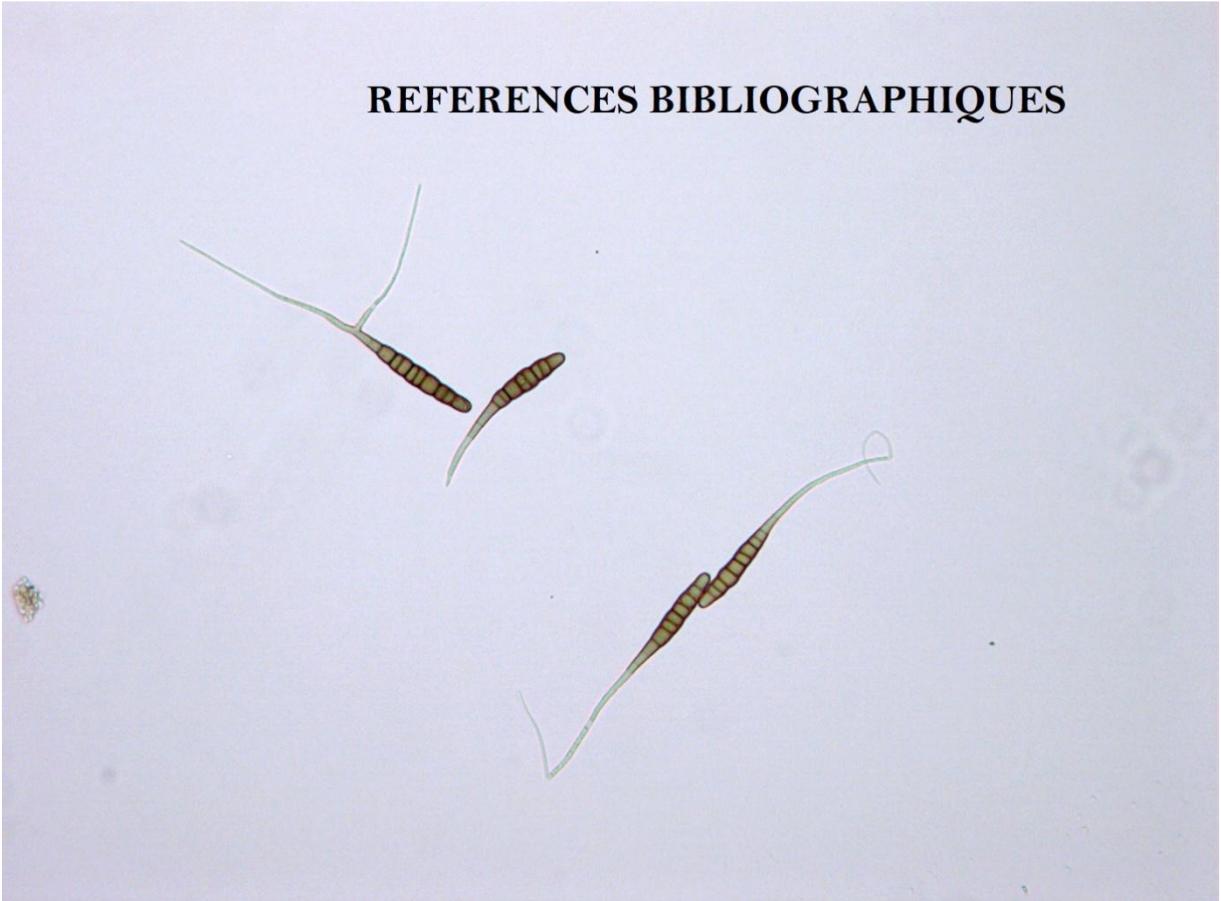
La maîtrise chimique de la maladie et notamment l'utilisation des fongicides à base de strobilurine et triazole a été vérifiée et nos résultats montrent qu'ils sont toujours des inhibiteurs efficaces de la germination des spores et la croissance mycélienne des *Alternaria* spp. Cependant, l'azoxystrobine peut provoquer l'effondrement du mycélium et inhiber l'infection. Cette double action peut permettre aux producteurs en Algérie d'appliquer les produits à titre préventif pour réduire ainsi la gravité de la maladie d'une part et évaluer la résistance aux fongicides lors des deux premières étapes du cycle de la vie de l'infection d'autre part. De ce fait, les producteurs vont pouvoir élaborer un programme de gestion plus efficace.

Comme perspectives de recherche une étude sur le complexe *Alternaria* englobant à la fois les petites et grandes conidies devrait être envisagée dans les différents étages bioclimatiques, dans le but de mieux préciser hiérarchiser l'importance les différentes espèces composant réellement ce pathosystème pomme de terre-tomate/*Alternaria* spp et dans les différents systèmes de culture. Cela est nécessaire du fait que l'*alternariose* est provoquée par les deux groupes d'espèces qui sont isolées de la même nécrose foliaire.

Concernant le travail préliminaire de diversité génétique ayant porté sur la seule espèce *A. solani* avec des marqueurs microsatellites, le nombre très limité d'isolats étudié n'est pas significatif. Il serait intéressant d'élargir cette étude à une large gamme d'isolats des deux plantes hôtes (pomme de terre et tomate) des différents étages bioclimatiques mais aussi sur le reste des autres espèces à grandes conidies assez présentes dans les deux cultures, notamment *A. linariae* et *A. grandis*. Il reste que les marqueurs microsatellites utilisés restent peu polymorphiques au vue de la grande diversité obtenue dans d'autres pays. Par conséquent des marqueurs spécifiques aux différentes espèces à grandes conidies présentes en Algérie : *A. solani*, *A. protenta*, *A. grandis* et *A. linariae*.

A propos des fongicides étudiés susceptibles d'être utilisés comme moyen de lutte contre l'*alternariose* de la pomme de terre et la tomate, notre première approche nous a permis d'évaluer le niveau de résistance des 04 espèces d'*Alternaria* à grandes conidies vis-à-vis des 02 matières actives sur un nombre élevé d'isolats actuellement largement utilisée en Algérie : azoxystrobine et difenoconazole. La technique classique *in vitro* d'incorporation des matières actives dans un milieu de culture a été indicative et complétée par une nouvelle approche néphrométrique qui s'est avérée informative de la présence d'isolats résistants. Il serait plus intéressant de pouvoir utiliser à l'avenir des marqueurs moléculaires plus fiables pour une détection directe des gènes de résistance afin de mieux évaluer les changements des isolats à l'égard de ces fongicides et maîtriser ainsi cette question de contrôle de l'*alternariose*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adhikari, P., Yeonyee, O. & Panthee, D. R. 2017. Current status of early blight resistance in tomato: an update. *International Journal of Molecular Sciences* **18** : 1-22.
- Agarwal, A., Garg, G.K., Devi, S., Mishra, D.P. and Singh, U.S. (1997). Ultrastructural changes in Brassica leaves caused by *Alternaria brassicae* and destruxin B. *J Plant Biochem Brassica Biotechnol* . . **6**, 25–28
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*, 5th edition. Academic Press, New York, USA. 922 pp.
- Akamatsu, H., Taga, M., Kodama, M., Johnson, R., Otani, H., and Kohmoto, K. 1999. Molecular karyotypes for *Alternaria* plant pathogens known to produce host-specific toxins. *Current Genetics*. **35**: 647-656.
- Andrade, A.C., Del Sorbo, G., Van Nistelrooy, J.G.M., De Waard, M.A. 2000. The ABC transpoter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. *Microbiology*. **146**: 1987-1997.
- Andersen, B., Dongo, A. & Pryor, B. M. 2008. Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila*. *Mycological Research* **112**: 241–250.
- Annis, S. L. & Goodwin, P. H. 1997. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* **103**: 1-14.
- Aradhya, MK. Chan, HM. Parfitt, DE. 2001. Genetic variability in the pistachio late blight fungus *Alternaria alternata*. *Mycological Research*. **105**: 300-306.
- Ayad D., Aribi D., Hamon B., Kedad A., Bouznad Z., Simoneau P. 2019. Distribution of large-spored *Alternaria* species associated with potato and tomato early blight according to hosts and bioclimatic regions of Algeria . *Phytopathologia Mediterranea* **58**(1): 139-149.
- Ayad D., Hamon B., Kedad A., Bouznad Z., Simoneau P. 2018. First report of early blight caused by *Alternaria linariae* on potato in Algeria. *Plant Disease*. 2018. **Vol. 102 n°12** p. 2651

- Ayad D., Hamon B., Kedad A., Simoneau P., Bouznad Z. 2018. New data on early blight of potato caused by a complex of large-spored *Alternaria* species in Algeria. In : *16th Congress of Euroblight. 9-14 mai, Aarhus*.
- Ayad, D., Leclerc, S., Hamon, B., Kedad, A., Bouznad, Z. & Simoneau, P. 2017. First report of early blight cause by *Alternaria protenta* on potato in Algeria. *Plant Disease* **101** : 836.
- Ayad, D., Mansouri, A., Moulay, Y., Kedad, A. & Bouznad, Z. 2015. Early blight of potato and tomato in Algeria: Importance of disease and phenotypic diversity of pathogenic species. 14th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and International Society of Mycotoxicology (Mediterranean Branch), Istanbul, Turkey, 25-29 August 2014. *Phytopathologia Mediterranea* **54** : 140-196
- Avenot, H, D. P. Morgan and T. J. Michailides.2008. Resistance to pyraclostrobin, boscalid and multiple resistance to Pristine ® (pyraclostrobin + boscalid) fungicide in *Alternaria alternata* causing *alternaria late blight* of *pistachios* in California. *Plant Pathology* (2008) **57**, 135–140
- Badaoui, M. I. & Berkani, A. 2010. Morphologie et comparaison des appareils génitaux de deux espèces invasives *Tuta absoluta* Meyrick 1917 et *Phthorimaea operculella* Zeller 1873 (Lepidoptera: Gelechiidae). *Entomologie faunistique – Faunistic Entomology* **63** : 191-194.
- Baloch, R. & Ahlers, J. 1984. Influence of cations on the mode of action of miconazole on yeast cells. *Chemico-Biological Interactions* **50** : 213-218.
- Barksdale, TH. 1969. Resistance of tomato seedlings to *early blight*. *Phytopathology*. 59:443-446.
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* **58** : 649-662.
- Bashan, Y. Levanony, H. and Or, R. 1991. Association between *Alternaria macrospora* and *Alternaria alternata*, causal agents of cotton leaf blight. *Canadian Journal of Botany* **69**: 2603-2607.
- Bashi, E. & Rotem, J. 1975. Sporulation of *Stemphylium botryosum* f. sp. *lycopersici* in tomatoes and of *Alternaria porri* f. sp. *solani* in potatoes under alternating wet-dry regimes. *Phytopathology* **65** : 532-535.

- Batista, D. C., Lima, M. A., Haddad, F., Maffia, L. A. & Mizubuti, E. S. G. 2006. Validation of decision support systems for tomato early blight and potato late blight, under Brazilian conditions. *Crop Protection* **25** : 664-670.
- Berto, P. Belingheri, L. Dehoeter, B. 1997. Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria brassicicola*. *Biotechnology Letters*. **19** (6): 533- 536.
- Bessadat, N. 2014. Isolement, identification et caractérisation des *Alternaria* sp. responsables de la détérioration des plantes maraichères par des systèmes enzymatiques et moléculaires. Thèse de doctorat LMD. Université d'Oran Es Sénia. 199 pp
- Bessadat, N., Benichou, S., Kihal, M. & Henni D. E. 2014. Aggressiveness and morphological variability of small spore *Alternaria* species isolated from Algeria. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* **2(2s)** : 265-278
- Bessadat, N., Berruyer, R., Hamon, B., Bataille-Simoneau, N., Benichou, S., Kihal, M., Henni, D. E et Simoneau, P. 2017. *Alternaria* species associated with early blight epidemics on tomato and other *Solanaceae* crops in northwestern Algeria. *European Journal of Plant Pathology* **148** : 181-197.
- Bessadat, N. 2014. Isolement, identification et caractérisation des *Alternaria* sp. Responsables de la détérioration des plantes maraichères par des systèmes enzymatiques et moléculaires. Thèse de doctorat LMD, 185p.
- Bessadat, N., B.Hamon, J. E. Henni and P. Simoneau, 2016. First report of tomato early blight caused by *Alternaria grandis* in Algeria. *Plant Disease*, **100**, 533.
- Birch, P. R. J., Bryan, G. J., Fenton, B., Gilroy, E. M., Hein, I., Jones, J. T., Prashar, A., Taylor, M. A., Torrance, L. & Toth, I. K. 2012. Crops that feed the world 8: Potato: are the trends of increased global production sustainable. *Food Security*. **4** : 477-508.
- Birnboim, H.C. 1983. A rapid alkaline extraction method for isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**: 243-255.
- Blancard, D., Laterrot, H., Marchoux, G. & Candresse, T. 2012. A colour Handbook - Tomato Diseases : identification, biology and control. Manson Publishing Ltd. London, UK. 688 pp.
- Bock, C. H., Thrall, P. H., Brubaker, C. L. & Burdon, J. J. 2002. Detection of genetic variation in *Alternaria brassicicola* using AFLP fingerprinting. *Mycological Research* **106** : 428-434.
- Bonde, R., 1929. Physiological strains of *Alternaria solani*. *Phytopathology* **19** : 533-548.

- Bowen W. T. 2003. Water productivity and potato cultivation. Pp. 229-238. In : *Water Productivity in Agriculture : Limits and Opportunities for Improvement*. Ed. J. W. Kinje, R. Baker and D. Molden. CAB international.
- Brent, K. J. & Hollomon, D. W. 1998. Fungicide resistance : the assessment of risk, FRAC, Global Crop Protection Federation, Brussels, Monograph No 2, pp 1-48.
- Brent, K. J. & Hollomon, D. W. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? 2nd edition. Fungicide Resistance Action Committee
- Campo, A. R. O., Zambolim, L., Vale, F. X. R., Costa, L. C. & Martyinez, C. A. 2001. Efeito da pinta preta (*Alternaria solani*) no crescimento e produção da batata (*Solanum tuberosum* L.). *Fitopatologia Brasileira Suppl.* **26** : 450.
- Cardoso, C. R. 2014. Potato and tomato early blight: molecular identification of alternaria species, host range and epidemics. Ph.D thesis, Universidade Federal de Viçosa, Brazil. VII + 90 pp.
- Castro, M. E. A., Zambolim, L., Chavez, G. M., Cruz, C. D. & Matsuoka, K. 2000. Pathogenic variability of *Alternaria solani*, the causal agent of tomato early blight. *Summa Phytopathologica* **26**: 24-28.
- Chaerani, R. & Voorrips, R. E. 2006. Tomato early blight (*Alternaria solani*) : The pathogen, genetics, and breeding for resistance. *Journal of General Plant Pathology.* **72** : 335-347.
- Chandrasekaran, M., Chandrasekar, R., Sa, T. & Sathiyabama, M. 2014. Serine protease identification (in vitro) and molecular structure predictions (in silico) from a phytopathogenic fungus, *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Sorauer. *Journal of Basic Microbiology* **54** : S210-S218.
- Chandrasekaran, M., Chandrasekar, R., Chun, S. C. & Sathiyabama, M. 2016a. Isolation, characterization and molecular three-dimensional structural predictions of metalloprotease from a phytopathogenic fungus, *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Sor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **122** : 131-139.
- Chandrasekaran, M., Thangavelu, B., Chun, S. C. & Sathiyabama, M. 2016b. Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity. *Journal of General Plant Pathology* **82** : 233-239.

- Chemak, F., Allagui, L., Ali, Y. 2014. Analyse des performances techniques des producteurs de la pomme de terre en Tunisie. Une Approche non paramétrique. *New Medit* **13** : 72-80.
- Chowdappa, P., Kumar, S. P. M., Lakshmi, M. J. & Upreti, K. K. 2013. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological Control* **65** : 109-117.
- Cooke, D. E. L., Forster, J. W., Jenkins, P. D., Jones, D. G. & Lewis, D. M. 1998. Analysis of intraspecific and interspecific variation in the genus *Alternaria* by the use of RAPD-PCR. *Annals of Applied Biology* **132** : 197-209.
- Dahmen, H. & Staub, T. 1992. Protective, curative, and eradicator activity of difenoconazole against *Venturia inaequalis*, *Cercospora arachidicola*, and *Alternaria solani*. *Plant Disease* **76** : 774-777.
- De Broglie, L. A. & Guérault, D. 2005. *Tomates d'hier et d'aujourd'hui*. Paris, Hoëbeke. 143 pp.
- Delp, C. J. 1980. Coping with resistance to plant disease. *Plant Disease* **64** : 652-657.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J. F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J. M., & Gascuel, O. 2008. Phylogeny. Fr : robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* **1**: 36.
- Dita Rodriguez, M. A., Brommonschenkel, S. H., Matsuoka, K. & Mizubuti, E. S. G. 2006. Components of resistance to early blight in four potato cultivars: Effect of leaf position. *Journal of Phytopathology* **154** : 230-235.
- Doi, R. H. & Kosugi, A. 2004. Cellulosomes : plant-cell-wall degrading enzyme complexes. *Nature Reviews Microbiology* **2** : 541-551.
- Dongo, A. 2005. Comparative analysis of *Alternaria* species. Thesis of Ph.D. dissertation. University of VESZPRÉM GEORGIKON FACULTY OF AGRICULTURE SCIENCES KESZTHELY.
- Douglas, D. R. & Groskopp, M. D. 1974. Control of early blight in eastern and south central Idaho. *American Potato Journal* **51** : 361-368.
- Dube, J. P. 2014. Characterization of *Alternaria alternata* isolates causing brown spot of potatoes in South Africa. MSc Dissertation, University of Pretoria, Pretoria. 97 pp.
- Elansky, S., Pobedinskaya, M., Kokaeva, L., Statsyuk, N. & Alexandrova, A. 2012. Molecular identification of the species composition of Russian isolates of pathogens, causing early

- blight of potato and tomato. Euroblight. PPO-Special Report, Wageningen University Lelystad, The Netherland. **15** : 151-156.
- Elliott, J. A. 1917. Taxonomic characters of the genera *Alternaria* and *Macrosporium*. *American Journal of Botany* **4** : 439-476.
- Ellis, M. B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK. 608 pp
- Ellis, M. B. 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK. 505 pp
- Ellis MB, Gibson IAS (1975) *Alternaria solani*. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 475. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Ellis, J.B., Martin, G.B., 1882. *Macrosporium solani* E&M. *American Naturalist* **16**, 1003.
- FAOSTAT. 2019. <http://www.fao.org/faostat/fr/#data>.
- Foolad, M. R., Merk, H. L. & Ashrafi, H. 2008. Genetics, genomics and breeding of late blight and early blight resistance in tomato. *Critical Reviews in Plant Sciences* **27** : 75-107.
- Foolad, M. R., Merk, H. L. & Ashrafi, H. 2008. Genetics, Genomics and Breeding of Late Blight and Early Blight Resistance in Tomato. *Critical Reviews in Plant Sciences* **27** : 75-107.
- Fancelli, M. I. 1991. Comparação patogênica, cultural, serológica e eletroforética entre isolados de *Alternaria solani* do tomate e da batata e variabilidade patogênica de *A. solani f. sp. lycopersici* N. F. Ph.D. thesis, Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, Brazil.
- Fraser, J. T., & Zitter, T. A. (2003). Two species of *Alternaria* cause early blight of potato (*Solanum tuberosum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Phytopathology*, **93**, (supplement) S3.
- Fries, E. 1832. *Systema Mycologicum*. Vol. 3, E. Moritz, Greifswald. 500 pp.
- Fritz, M. 2005. Resistance induction in the pathosystem tomato-*Alternaria solani* . [Gießen] : Biometrie und Populations genetik. Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung II der Justus-Liebig-
- Fry, W. E. 2007. The canon of potato science : 10. late blight and early blight. *Potato research* **50** : 243-245.
- Galloway B T 1891. The new potato disease. *Garden and Field, Adelaide, Australia* 16: 158.

- Gannibal, P. B., Orina, A. S. 2013. Characterization of a tomato pathogen, *Alternaria tomatophila*, previously unidentified in Russia. *Mikologiya I Fitopatologiya* **47**: 51-55.
- Gannibal, P. B., A. S. Orina, N. V. Mironenko and M. M. Levitin, 2014. Differentiation of the closely related species, *Alternaria solani* and *A. tomatophila*, by molecular and morphological features and aggressiveness. *Eur J Plant Pathol.*, **139**, 609–623.
- Ganie, S. A., Ghani, M. Y., Nissar, Q., Jabeen, N., Anjum, Q., Ahanger, F. A. & Ayaz, A. 2013. Status and symptomatology of early blight (*Alternaria solani*) of potato (*Solanum tuberosum* L.) in Kashmir valley. *African Journal of Agricultural Research* **8** : 5104-5115.
- Gannibal, P. B., Orina, A. S., Mironenko, N. V. & Levitin, M. M. 2014. Differentiation of the closely related species, *Alternaria solani* and *A. tomatophila*, by molecular and morphological features and aggressiveness. *European Journal of Plant Pathology*. **139** : 609-623.
- Gannibal, P. B., Orina, A. S., Mironenko, N. V. & Levitin, M. M. 2014. Differentiation of the closely related species, *Alternaria solani* and *A. tomatophila*, by molecular and morphological features and aggressiveness. *European Journal of Plant Pathology* **139** : 609-623.
- Gardes, M. & Bruns, T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2** : 113-118.
- Gerszberg, A., Wiktorek-Smagur, A., Hnatuszko-Konka, K., Łuchniak, P. & Kononowicz, A. K. 2012. Expression of recombinant staphylokinase, a fibrin-specific plasminogen activator of bacterial origin, in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28** :1115-1123.
- Gisi, U., Binder, H. & Rimbach, E. 1985. Synergistic interactions of fungicides with different modes of action. *Transactions of the British Mycological Society* **85** : 299-306.
- Gisi, U., Chin, K. M., Knapova, G., Küng Färber, R., Mohr, U., Parisi, S., Sierotzki, H. & Steinfeld, U. 2000. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop Protection* **19** : 863-872.
- Goodwin, D. C. & Lee, S. B. 1993. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques* **15**: 438–444.

- Grum-Grzhimaylo, A. A., Georgiva, M. L., Bondarenko, S. A., Debets, A. J. M. & Bilanenko E. N. 2015. On the diversity of fungi from soda soils. *Fungal Diversity* **76** : 27-74.
- Guan, J., Braks, H. M. J., Kerkenaar, A. & De Waard, M. A. 1992. Interaction of microsomal cytochrome P450 isozymes isolated from *Penicillium italicum* with DMI fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **42** : 24-34.
- Gudmestad, N. C., Arabiat, S., Miller, J.S. & Pasche, J. S. 2013. Prevalence and impact of SDHI fungicides resistance in *Alternaria solani*. *Plant Disease* **97** : 952-960.
- Guenauoui, Y. 2008. Nouveau ravageur de la tomate en Algérie : Première observation de *Tuta absoluta*, mineuse de la tomate invasive, dans la région de Mostaganem, au printemps 2008. *Phytoma-La Défense des Végétaux* no. **617** :18-19.
- Guthrie, J. W.1958. Early blight of potatoes in southeastern Idaho. *Plant Disease Reporter* **42** : 246.
- Hantula, J. & Müller, M. M. 1997. Variation within *Cremmeniella abietina* in Finland and other countries as determined by random amplified microsatellites (RAMS). *Mycological Research* **101** : 169-175.
- Hantula, J., Dusabenyagasani, M. & Hamelin, R. C. 1996. Random amplified microsatellites (RAMS) - a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *European Journal of Forest Pathology* **26** : 159-166.
- Hantula, J., Niemi, E. M., Kaitera, J., Jalkanen, R. & Kurkela, T. 1998. Genetic variation of the resin top fungus in Finland as determined by random amplified microsatellites (RAMS). *European Journal of Forest Pathology* **28** : 361-372.
- Harris, N. D., Karahadian, C. & Lindsay, R. C. 1986. Musty aroma compounds produced by selected molds and actinomycetes on agar and whole wheat bread. *Journal of Food Protection* **49** : 964-970.
- Henning RG & Alexander LJ, 1959. Evidence of existence of physiologic races of *Alternaria solani*. *Plant Disease Reporter* **43** : 298-308.
- Holley, J. D., Hall, R. & Hofstra, G. 1985. Effects of cultivar resistance, leaf wetness duration and temperature on rate of development of potato early blight. *Canadian Journal of Plant Science* **65** : 179-184.

- Hong, S. G., Cramer, R. A., Lawrence, C. B. & Pryor, B. M. 2005. Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa : analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genetics and Biology* **42** : 119-129.
- Horsfall, J. G. & Henberger, J. W. 1942. Measuring magnitude of defoliation disease of tomatoes. *Phytopathology* **32** : 226-232.
- Horsfield, A., Wicks, T., Davies, K., Wilson, D. & Paton, S. 2010. Effect of fungicides use strategies on the control of early blight (*Alternaria solani*) and potato yield. *Australasian Plant Pathology* **39** : 368-375.
- Hubballi, M., Nakkeeran, S., Raguchander, T., Rajendran, L., Renukadevi, P. & Samiyappan, R. 2010. First report of leaf blight of noni caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. *Journal of General Plant Pathology* **76** : 284-286
- Ichihara, A., Tazaki, H. & Sakamura, S. 1983. Solanapyrones A, B and C. Phytotoxic metabolites from the fungus *Alternaria solani*. *Tetrahedron Letters* **24** : 5373-5376.
- Jashni, M. K., Mehrabi, R., Collemare, J., Mesarich, C. H. & de Wit P. J. 2015. The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant–pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* **6** : 584.
- Johnson, K. B. & Teng, P. S. 1990. Coupling a disease progress model for early-blight to model of potato growth. *Phytopathology* **80** : 416-425.
- Joly, P. 1964. Le genre *Alternaria*: recherches physiologiques, biologiques et systématiques. *Encyclopédie Mycologique* **33** : 1-250
- Jones, J. B., Zitter, T. A., Momol, T. M. & Miller, S. A. 2014. *Compendium of Tomato Diseases and Pests*, Second Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN, U.S.A., 168 pp.
- Jones, L. R. & Grout, A. J. 1897. Notes on two species of *Alternaria*. *Bulletin of the Torrey Botanical Society* **24**: 254-258.
- Joseph, A., Igbinsosa, O. B., Alori, E. T., Ademiluyi, B. O. & Aluko, A. P. 2017. Effectiveness of *Pseudomonas* species in the management of tomato early blight pathogen *Alternaria solani*. *African Journal of Microbiology Research* **11** : 972-976.

- Joubert, A., Bataille-Simoneau, N., Champion, C., Guillemette, T., Hudhomme, P., Iacomini-Vasilescu, B., Leroy, T., Pochon, S., Poupard, P. & Simoneau, P. 2011. Cell wall integrity and high osmolarity glycerol pathways are required for adaptation of *Alternaria brassicicola* to cell wall stress caused by brassicaceous indolic phytoalexins. *Cellular Microbiology* **13** : 62–80.
- Kapsa, J. S. 2008. Important threats in potato production and pathogen pest management. *Potato Research* **51** : 385-401.
- Kasahara, K., Miyamoto, T., Fujimoto, T., Oguri, H., Tokiwano, T., Oikawa, H., Ebizuka, Y. & Fujii, I. 2010. Solanapyrone Synthase, a Possible Diels-Alderase and Iterative Type I Polyketide Synthase Encoded in a Biosynthetic Gene Cluster from *Alternaria solani*. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **11** : 1245–1252.
- Kemmitt, G. 2002. Early blight of potato and tomato. In :The Plant Health Instructor. The American Phytopathological Society (APS). St. Paul, MN, USA. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-0809-01.
- Khalaf, M Alhussaen. 2012. Morphological and Physiological characterization of *Alternaria solani* isolates of tomato in Jordan valley. *Research Journal of Biological Sciences*. **7** (8): 316- 319.
- Kim, W., Park, C.M., Park, J. J., Akamatsu, H. O., Peever, T. L., Xian, M., Gang, D. R., Vandemark, G. & Chen, W. D. 2015. Functional analyses of the diels-alderase gene sol5 of *Ascochyta rabiei* and *Alternaria solani* indicate that the solanapyrone phytotoxins are not required for pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28** : 482-496.
- Kokaeva, L. Y., Belosokhov, A. F., Doeva, L. Y., Skolotneva, E. S. & Elansky, S. N. 2018 Distribution of *Alternaria* species on blighted potato and tomato leaves in Russia. *Journal of Plant Diseases and Protection* **125** : 205-212
- Kokaeva, L. Y., Belosokhov, A. F., Skolotneva, E. C., Doeva, L. Y., Skolotneva, E. S. & Elansky, S. N. 2018. Distribution of *Alternaria* species on blighted potato and tomato leaves in Russia. *Journal of Plant Diseases and Protection* **125** : 205-212.
- Kolte, S. J. 2002. Diseases and their management in oilseed crops - New paradigm. Pp. 244-252. In : *Oilseeds and oils : researches and development needs*. Eds. Rai, M., Singh, H. & Hedge, D.M. Indian Soc. Oilseed Res. Hyderabad, India.

- Kubicek, C. P., Starr, T. L. & Glass, N. L. 2014. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **52** : 427-451.
- Kumar, S. Singh, R. Kashyap, PL. Srivastava, AK. 2013. Rapid detection and quantification of *Alternaria solani* in tomato. *Scientia Horticulturae*. **151**: 184-189.
- Kumar, V., Haldar, S., Pandey, K. K., Singh, R. P., Singh, A. K. & Singh, P. C. 2008. Cultural, morphological, pathogenic and molecular variability amongst tomato isolates of *Alternaria solani* in India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24** : 1003-1009.
- Landschoot, S., Vandecasteele, M., De Baets, B., Höfte, M., Audenaert, K. & Haesaert, G. 2017. Identification of *A. arborescens*, *A. grandis*, and *A. protenta* as new members of the European *Alternaria* population on potato. *Fungal biology* **121** :172-188.
- Lawrence, D. P., Gannibal, P. B., Dugan, F. M. & Pryor, B. M. 2014. Characterization of *Alternaria* isolates from the infectoria species-group and a new taxon from *Arrhenatherum*, *Pseudoalternaria arrhenatheria* sp. nov. *Mycological Progress* **13** : 257-276.
- Lawrence, D. P., Gannibal, P. B., Peever, T. L. & Pryor, B. M. 2013. The sections of *Alternaria* : formalizing species-group concepts. *Mycologia* **105** : 530-546.
- Lawrence, D. P., Park, M. S., Pryor, B. M. 2012. *Nimbya* and *Embellisia* revisited, with *nov. comb* for *Alternaria celosiae* and *A. perpunctulata*. *Mycological Progress* **11** : 799-815.
- Lawrence, D. P., Rotondo, F. & Gannibal, P. B. 2016. Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress* **15** : 1-22.
- Leiminger, J. H. & Hausladen, H. 2012. Early blight control in potato using disease-orientated threshold values. *Plant Disease* **96** : 124-130.
- Leroux, L. & Waker A. S. 2011. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Sciences* **67** : 44-59.
- Leroux, P. & Gredt, M. 1982. Phenomenes de resistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides. *Defense des végétaux* n° 213 : 3-17.
- Leroux, P. 2003. Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. *Comptes Rendus Biologies* **326** : 9-21.

- Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M. & Walker, A. S. 2007. Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 alpha-demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerelia graminicola*. *Pest Management Science*, **63** : 688–698.
- Leroux, P., Delorme, R. 1997. La respiration cellulaire, une cible toujours d'actualité pour divers groupes de produits phytosanitaires. *Phytoma*, **494** : 17-23.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M. & Chapeland, F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* **58** : 876-888.
- Lim, S., Notley-McRobb, L., Lim, M. & Carter, D. A. 2004. A comparison of the nature and abundance of microsatellites in 14 fungal genomes. *Fungal Genetics and Biology* **41** : 1025-1036.
- Liu, D., Anderson, N.A and Kinkel, L.L. 1995. Biological control of potato scab in the field with antagonistic *Streptomyces scabies*. *Phytopathology* **85**: 827-831.
- Lourenço, V., Jr., Moya, A., González-Candelas, F., Carbone, I., Maffia, L. A. & Mizubuti, E. S. G. 2009. Molecular diversity and evolutionary processes of *Alternaria solani* in Brazil inferred using genealogical and coalescent approaches. *Phytopathology* **99** : 765-774.
- Lu, Y.L., Sutton, T.B., Ypema, H. 2003. Sensitivity of *Alternaria mali* from North Carolina apple orchards to pyraclostrobin and boscalid. *Phytopathology*. **93**. S54.
- Lukens, R.J., 1963, Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. *Am. J. Bot.*, 50 : 720- 724.
- Lukens RJ, Horsfall JG (1968) Glycolate oxidase, a target for antsporulants. *Phytopathology* 58:1671–1673.
- Ma Z, Felts D, Michailides TJ, 2003. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **77**, 66–74.
- MADRP, 2014. Ministère de l’agriculture et du développement rural et de la pêche. Service statistiques.
- MADRP, 2016. Ministère de l’agriculture et du développement rural et de la pêche. Service statistiques.

- Madan, M. Thind, K.S. 1998. Physiology of fungi. A.P.H. Publishing Corporation, New Delhi, India.
- Mantecón, J.D. (2007). Potato yield increases due to fungicide treatment in Argentinian early blight (*Alternaria solani*) and late blight (*Phytophthora infestans*) field trials during the 1996-2005 seasons. Online. *Plant Health Progress* doi :10.1094/PHP-2007-0202-01-RS.
- Martinez, S. P, Snowdon, R. & Pons-Kuhnemann, J. 2004. Variability of Cuban and international populations of *Alternaria solani* from different hosts and localities: AFLP genetic analysis. *European Journal of Plant Pathology* **110** : 399-409.
- McCallan, S. E. A. & S. Y. Chan (1944) Inducing sporulation of *Alternaria solani* in culture. *Contrib. Boyce. Thmpson Inst.* **13**: 323—335.
- Miller, J. & Miller, T. 2005. Use of foliar fungicides for managing potato diseases. Proceedings of the Idaho Potato Conference held at Pocatello Idaho, 19–20 January 2005.
- Miyamoto, T., Ishii, H., Stammler, G., Koch, A., Ogawara, T., Tomita, Y., Fountaine, J.M., Ushio, S., Seko, T., Kobori, S., 2010. Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid **59**, 873e881.
- Mondal KK, Rana SS, Sood P, Singh Y (2002) Kalazira: a new host for *Alternaria burnsii*. *Indian Phytopathol* **55**:532.
- Montemurro, N. & Visconti, A. 1992. *Alternaria* metabolites – chemical and biological data. Pp 449-558. In : *Alternaria Biology, Plant Disease and Metabolites*. Chelkowski, J. & Visconti, A., eds. Amsterdam, the Netherlands : Elsevier Science Publishers
- Moore, W. D. & Thomas, H. R. 1943. Some cultural practices that influence the development of *Alternaria solani* on tomato seedlings. *Phytopathology* **33** : 1176-1184.
- Morris, P. F., Connolly, M. S., & St. Clair, D. A. 2000. Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. *Mycological Research* **104** : 286-292.
- Neergaard, P. 1945. *Danish Species of Alternaria and Stemphylium*. Oxford University Press, London. 560 pp
- Nees von Esenbeck, C. G. D. 1816-1817. *Das System der Pilze und Schwämme*. Stahelschen Buchhandlung, Würzburg, Germany. 329 pp

- Nolte, P. 2008. Brown spot and black pit of potato: the other early blight. *American Vegetable Grower* **56** : 32-33.
- O'Gorman, C.M., Fuller, H.T., Dyer, P.S. 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature Letters* **457**: 471-475.
- Orina A.S., Gannibal P.B., Levitin M.M. (2011). *Alternaria* species on potato in Russia. Euroblight Workshop.http://130.226.173.223/euroblight/Workshop/2011StPetersbrg/PPT/05_04Orina.pdf.
- Orina, A. S., Gannibal, P. B. & Levitin, M. M. 2010. Species diversity, biological characters and geography of *Alternaria* fungi associated with solanaceous plants. *Mikologiya I Fitopatologiya*, **44** : 150-159.
- Orina, A. S., Gannibal, Ph. B. & Levitin, M. M. 2012. *Alternaria* species on potatoes on Russia. Euroblight Workshop St. Petersburg. [[http://130.226.173.223/euroblight/Workshop/2011 St. Petersburg/PPT/05_04_Orina.pdf](http://130.226.173.223/euroblight/Workshop/2011StPetersburg/PPT/05_04_Orina.pdf)].
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium* : biology, ecology, and potential for bio-control. *Annual Review of Phytopathology* **23** : 23-54.
- Pasche, J. S. & Gudmestad, N. C. 2008. Prevalence, competitive fitness and impact of the F129L mutation in *Alternaria solani* in the United States. *Crop Protection* **27** : 427-435.
- Pasche, J. S., Wharam, C. M. & Gudmestad, N. C. 2004. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* in response to QoI-fungicides. *Plant Disease* **88** : 181-187.
- Pasche, J., Wharam, C. & Gudmestad, N. 2004. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* in response to QoI fungicides. *Plant Disease* **88** : 181-187.
- Pasche, J.S., Wharam, C.M., Gudmestad, N.C. 2002. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* (potato early blight) to strobilurin fungicides. Proceedings of the BCPC Conference Pests & Diseases. 841-846.
- Pelletier, J. & Fry, W. 1989. Characterization of resistance to early blight in three potato cultivars : incubation period, lesion expansion rate, and spore production. *Phytopathology* **9** : 511-517.

- Pelletier, J. R. & Fry, W. E. 1989. Characterization of resistance to early-blight in three potato cultivars : incubation period, lesion expansion rate, and spore production. *Phytopathology* **79** : 511-517.
- Pelletier, J. R. 1988. Computer simulation of cultivar resistance and fungicide effects on epidemics of potato early blight, Ph.D. thesis. Cornell University, Ithaca, NY. 127 pp.
- Petrunak, D. M. & Christ, B. J. 1992. Isozyme variability in *Alternaria solani* and *A. aleternata* *Phytopathology* **82** : 1343-1347.
- Preuss, C. G. T. 1851. Übersicht untersuchter Pilze, besonders aus der Umgegend von Hoyerswerda. *Linnaea* **24** : 99-153.
- Pryor, B. M. & Gilbertson, R. L. 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research* **104** : 312-1321.
- Pryor, B. M. & Gilbertson, R. L. 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research* **104** : 1312-1321.
- Pscheidt, J. R. 1985. Epidemiology and control of potato early blight, caused by *Alternaria solani*, Ph.D. thesis. University of Wisconsin-Madison, USA. 242 pp.
- Rands, R. D. 1917a. Early blight of potato and related plants. *Wisconsin Agricultural Experimental Station Research Bulletin* **42**: 1-48.
- Rands, R.D., 1917b, The production of spores of *Alternaria solani* pure culture. *Phytopathology*, **7**: 316-317.
- Rapilly, F. 1968. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Annales des Epiphyties*, **19** (N° hors-série). INRA. Paris. 102 pp.
- Ravikumar M.C. & Garampalli R. H. 2013. Antifungal activity of plants extracts against *Alternaria solani*, the causal agent of early blight of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **46** : 1897-1903.
- Reuveni, M., Sheglov, D. 2002. Effects of azoxystrobin, difenoconazole, polyoxin B (polar) and trifloxystrobin on germination and growth of *Alternata alternata* and decay in red delicious apple fruit. *Crop protection*. **21**: 951-955.
- Renaud, V. 2006. *Les tomates qui ont du goût*. Paris, Eugen Ulmer. 96 pp.

- Roberts, R. G., Reymond, S. T., & Andersen, B. 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research* **104** : 51-60.
- Rodriguez, M.A., Brommonschenkel, S.H., Matsuoka, K., Mizubuti, E.S.G. 2006. Components of resistance to early blight in four potato cultivars: Effect of leaf position. *Journal of Phytopathology* **154**: 230-235.
- Rodrigues, T.T.M.S, Berbee, M.L., Simmons, E.G., Cardoso, C.R., Reis, A., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., 2010. First report of *Alternaria tomatophila* and *A. grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. *New Disease Reports* **22**, 28. [<http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2010.022.028>]
- Rodrigues, T. T. M. S., Berbee, M. L., Simmons, E. G., Cardoso, C. R., Reis, A. & Maffia, L. A. 2010. First report of *Alternaria tomatophila* and *A. grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. *New Disease Reports* **22** : 28.
- Rosenzweig, N., Atallah, Z. K., Olaya, G. & Stevenson, W. R. 2008a. Evaluation of QoI fungicide application strategies for managing fungicide resistance and potato early blight epidemics in Wisconsin. *Plant Disease* **92** : 561-568.
- Rosenzweig, N., Olaya, G., Atallah, Z. K., Cleere, S., Stanger, C. & Stevenson, W. R. 2008b. Monitoring and tracking changes in sensitivity to azoxystrobin fungicide in *Alternaria solani* in Wisconsin. *Plant Disease* **92** : 555-560.
- Rossignol, L. & Rouselle-Bourgeois, F. 1996. Botanique, morphologie et taxinomie. Pp. 49-69. In : *La pomme de terre, production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations*. Eds P. Rouselle, Y. Robert et J.C. Crosnier. INRA éditions, Paris.
- Rotem, J. 1981. Fungal diseases of potato and tomato in the Negev region. *Plant Disease*. **65** : 315-318.
- Rotem, J. 1994. *The genus Alternaria : biology, epidemiology and pathogenicity*. APS Press, St Paul, Minnesota. 326 pp
- Rotem J, Reichert I (1964) Dew – a principal moisture factor enabling early blight epidemics in a semiarid region of Israel. *Plant Dis Rep* **48**:211–215.

- Rowell, J. B. 1953. Leaf blight of tomato and potato plants. Factors affecting the degree of injury incited by *Alternaria dauci* f.sp. *solani*. University of Rhode Island Agricultural Experimental Station Research Bulletin **320**
- Sarbhoy, AK. 1965. Nutritional studies of some members of Mucorales. VII. *Mycopath. Mycol. Appl.* 27: 120-128.
- Scheuermann, K.K., Falleiro, B.A.S., Reis, A., Brommonschenkel, S.H., Mizubuti, E.S.G. 2004. Seleção de marcadores RADP para estudo de diversidade genética de *Alternaria solani*. *Fitopatologia Brasileira* **29**:49-50.
- Sarkar, S., Beura, S. K., Nandi, A., Das, S., Dash, S. K., Senapati, N. & Patnaik, A. 2016. Management of Early blight of tomato (*Alternaria solani* Ellis and Martin) by chemicals and biocontrol agents under field condition. *Journal of Mycopathological Research* **54** : 81-84.
- Schlotterer C. 2004. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nat Rev Genet* 5:63–69.
- Schultz, D. & French, R. D. 2009. Early blight of potatoes and tomatoes. Texas AgriLife Extension Service, The Texas A & M System : PLPA-Pot009-01.
- Shaner, G. & Finney, R. E. 1977. The effect of nitrogen fertilisation on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* **67** : 1051-1056.
- Sharma, T. R. & Tewari, J. P. 1998. RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycological Research* **102** : 807-814.
- Sherf, A. F. & Macnab, A. A. 1986. *Vegetable Diseases and Their Control*. 2nd ed. John Wiley & Sons : New York, NY, USA, 728 pp.
- Shtienberg, D. & Fry, W. E 1990. Influence of host resistance and crop rotation on initial appearance of potato early blight. *Plant Disease* **74**: 849-852.
- Shtienberg, D., Blachinsky, D., Ben-Hador, G. & Dinooor, A. 1996. Effects of growing season and fungicide type on the development of *Alternaria solani* and on potato yield. *Plant Disease* **80** : 994-998.
- Shuman, J. L. 1995. Integrating a host resistance factor into a potato early blight forecasting model. MSc. Thesis. Pennsylvania State University, USA.

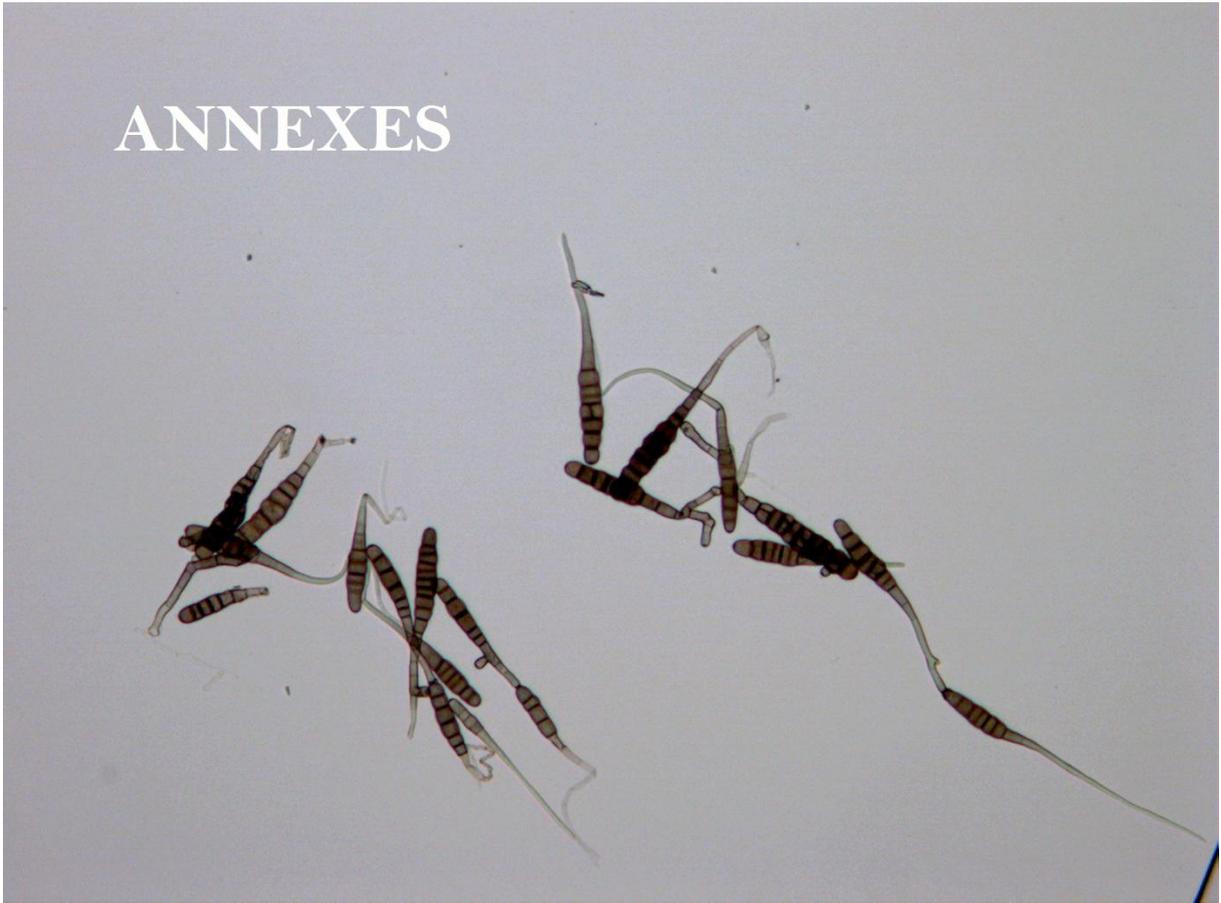
- Sid Ahmad, A., Sanchez, C. P. & Candela, M. E. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology* **106** : 817-824.
- Siegel, M. R. 1981. Sterol-inhibiting fungicides : Effects on sterol biosynthesis and sites of action. *Plant Disease* **65** : 986-989.
- Simmons, EG. 2007. *Alternaria*. An Identification Manual: CBS Biodiversity Series No. 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775 pp.
- Simmons, E. G 2000. *Alternaria* themes and variations (244-286). Species on Solanaceae. *Mycotaxon* **75** :1-115
- Simmons, E. G. 1967. Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycologia* **59** : 67-92
- Simmons, E. G. 1971. *Helminthosporium allii* as type of a new genus. *Mycologia* **63** : 380–386
- Simmons, E. G. 1989. *Macrospora* Fuckel (Pleosporales) and related anamorphs. *Sydowia* **41** : 314-329
- Simmons, E. G. 1992. *Alternaria* taxonomy : current status, viewpoint, challenge. Pp 1–35. In : *Alternaria: Biology, Plant Diseases and Metabolites*. Chelkowski J, Visconti A, eds. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science Publishers,
- Simmons, E. G. 2007. *Alternaria*. An identification manual. CBS Biodiversity Series 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. 775 pp.
- Simmons, E. G., & Roberts, R. G. 1993. *Alternaria* themes and variations (73). *Mycotaxon* **48** : 109-140.
- Solel, Z. & Kimchi, M. 1998. Histopathology of infection of *Minneola tangelo* by *Alternaria alternata* pv. *citri* and the effect of host and environmental factors on lesion development. *Journal of Phytopathology* **146** : 557-561
- Sorauer, P. 1896. Auftreten einer dem amerikanischen “Early blight” entsprechenden Krankheit an den deutschen Kartoffeln. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten* **6**: 1-9.

- Spolder, J., Ellens, R. & Turkensteen, L. 2013. Comparing pathogenicity of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* in potato. Fourteen Euroblight Workshop. Special report. **16** : 97-102.
- Stall, R. E. & Alexander, L. J. 1957. Heterocaryotic variation in *Alternaria solani*. *Phytopathology* **47** : 34.
- Stall, R. E. 1958. A investigation of nuclear number in *Alternaria solani*. *American Journal of Botany* **45**: 657-659.
- Stammler, G., Bohme, F., Philippi, J., Miessner, S., & Tegge, V. 2014. Pathogenicity of *Alternaria* species on potatoes and tomatoes. Fourteenth EuroBlight Workshop : Limassol, Cyprus. Special Report N° 16, 85-96.
- Staub, T. 1991. Fungicide resistance: practical experience with anti-resistance strategies and the role of integrated use. *Annual Review of Phytopathology* **29** : 421-442.
- Stevenson, W. R., Loria, R., Franc, G. D. & Weingartner, D. P. 2001. *Compendium of potato diseases*. Second edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN, U.S.A., 106 pp.
- Thomma, B. P. H. J. 2003. *Alternaria* spp. : from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* **4** : 225-236.
- Tsedaley, B. 2014. Review on early blight (*Alternaria* spp.) of potato disease and its management options. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* **4** : 2224-3208.
- Tymon, L. S. 2014. Frequency of isolation, determination, and epidemiology of *Alternaria* species on potato in the Pacific Northwest. Ph.D. Dissertation. Washington State University. Pullman. 112 pp.
- Tymon, L. S., Peever, T. L., & Johnson, D. A. 2016. Identification and enumeration of small-spored *Alternaria* species associated with potato in the U.S. Northwest. *Plant Disease* **100** : 465-472.
- Uchida, J. Y., Aragaki, M. & Yahata, P. S. 1986. Basidiospore Formation by *Ceratobasidium* sp. on Agar. *Mycologia* **78** : 587-592.
- Vakalounakis, D. J. & Christias, C. 1985. Light intensity, temperature and conidial morphology in *Alternaria cichorii*. *Transactions of the British Mycological Society* **85** : 425-430.

- Van der Waals, J. E., Korsten, L. & Aveling T. A. S. 2001. A review of early blight of potato. *African Plant Protection* **7** : 91-102
- Van der Waals, J. E., Korsten, L. & Slippers, B. 2004. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Disease* **88** : 959-964.
- Van der Waals, J. E., Pitsi, B. E., Marais, C., Wairuri, C. K., 2011. First report of *Alternaria alternata* causing leaf blight of potatoes in South Africa. *Plant Disease* **95** : 363.
- Varma, P. K., Singh, S., Gandhi, S. K. & Chaudhary, K. 2006. Variability among *Alternaria solani* isolates associated with early blight of tomato. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* **71** : 37-46.
- Von Keissler, K. 1912. Zur Kenntnis der Pilzflora Krains. *Beihefte zum Botanischen Zentralblatt* **29** : 434.
- Waals J.E., Korsten L., Slippers B. 2004. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Dis.* 88: 959–964.
- Waggoner PF, Horsfall JG, 1969. Epiderm : A simulator of plant Disease written for a computer. Bulletin N°698. New Haven connecticut. Connecticut Agricultural Experimental Station.
- Walker, J. C. 1952. *Diseases of Vegetable Crops*. McGraw-Hill Co., Inc., New York, N.Y. 529 pp
- Wallroth, C. F. W. 1833. *Flora cryptogamica Germaniae* sectio 2. J. L. Schrag, Nürnberg, Germany.
- Weir, T. L., Huff, D. R., Christ, B. J. & Romaine, C. P. 1998. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. *Mycologia* **90**: 813-821.
- Wharton, P. & Kirk, W. 2007. Early blight. Mich. State Ext. Bull. E-2991. Department of Plant, Soil and Microbial Science, Michigan State University, East Lansing
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322. In : *PCR protocols: a guide to methods and applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White, Eds. San Diego, CA: Academic Press.

- Wiltshire, S. 1933. The foundation species of *Alternaria* and *Macrosporium*. *Transactions of the British Mycological Society* **18** : 135-160.
- Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M. & Crous, P. W. 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* **75** : 171-212.
- Woudenberg, J. H. C., Truter, M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. 2014. Large spore *Alternaria* pathogens in section Porri disentangled. *Studies in Mycology* **79** : 1-47
- Yeole, G. J., Teli, N. P., Kotkar, H. M. & Mendki, P. S. 2014. *Cinnamomum zeylanicum* extracts and their formulations control early blight of tomato. *Journal of Biopesticides*.**7** : 110-123.
- Zhou, Z., Miwa, M. & Hogetsu, T. 1999. Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). *New Phytologist* **144**: 55-63.
- Zhou, Z., Miwa, M. & Hogetsu, T. 2001. Polymorphism of simple sequence repeats reveals gene flow within and between ectomycorrhizal *Suillus grevillei* populations. *New Phytologist* **149** : 339-348.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20** : 176-183.
- Zitter, T. A. & Drennan, J. L. 2005. Shift in performance of fungicides for the control of tomato early blight. *In* : Proceedings in the 20th Annual Tomato Disease Workshop. Ohio State University, Ohio : 28-30.

ANNEXES



ANNEXE 1

Prospection et échantillonnage *Alternariose* / PDT + Tomate en Algérie (2012-2015)Groupe d'isolats d'*Alternaria* spp

N°	Code	Origine	Plante Hôte	Variété	Type de nécrose + couleur + forme	Aspect cultural	Sporulation
01	42.12. PAS01	Fouka - Tipaza	PDT	Spunta	GN marron de forme ronde	Culture homogène marron	Abondante
02	42.12. PAS02	Tipaza	PDT	Spunta	GN marron de forme ronde	Culture homogène, vert clair + masse mycélienne cotonneuse	Absence
03	42.12. PAS03	Tipaza	PDT	Spunta	MN marron foncé de forme ronde	Culture homogène verte.	Moyenne
04	42.12. PAS04	Tipaza	PDT	Spunta	MN Miel de forme ronde	Culture homogène vert très clair	Absence
05	16.12. PAS05	Staouéli	PDT	Spunta	GN Marron de forme ronde	Culture homogène marron	Moyenne
06	16.12. PAS06	Staouéli	PDT	Spunta	GN marron de forme irrégulière	Culture homogène verte + masse mycélienne cotonneuse	Très faible
07	16.12. PAS07	Staouéli	PDT	Spunta	GN marron foncé	Culture homogène marron	Moyenne
08	16.12. PAS08	Staouéli	PDT	Spunta	MN marron clair	Culture homogène marron en cercles concentriques	Moyenne
09	16.12. PAS09	Staouéli	PDT	Spunta	PN marron foncé	Culture homogène marron foncé	Moyenne
10	16.12. PAS10	Staouéli	PDT	Spunta	MN marron	Culture homogène vert très foncé	Absence
11	16.12. PAS11	Staouéli	PDT	Spunta	TPN noir	Culture homogène marron jaunatre	Absence
12	16.12. PAS12	Staouéli	PDT	Spunta	GN marron	Culture homogène marron	Absence
13	16.12. PAS13	Staouéli	PDT	Spunta	GN marron	Culture homogène vert	Absence

14	16.12. PAS14	Staouéli	PDT	Spunta	GN marron	Culture homogène marron	Absence
15	xx.12. PAS15	Djendel	PDT	Cayene	GN marron	Culture homogène vert marron clair	Abondante
16	xx.12. PAS16	Djendel	PDT	Cayène	GN marron	Vert dense + mycélium cotonneux	Moyenne
17	xx.12. PAS17	Oued Abbas	PDT	Désirée	GN marron	Cercles concentriques + alternance de couleur marron foncé et vert clair	Abondante
18	xx.12. PAS18	Oued Abbas	PDT	Bartina	GN marron	Cercles concentriques + alternance de couleur vert foncé et marron clair	Abondante
19	10.12. PAS19	Bouira	PDT	Burene	GN marron foncé à contour clair. 1 seule nécrose par feuille	Alternance de couleur marron en cercles concentré	Moyenne
20	10.12. PAS20	Bouira	PDT	Nicolas	GN marron + jaunissement	Culture homogène marron	Moyenne
21	10.12. PAS21	Bouira	PDT	Désirée	GN marron + jaunissement	Alternance de couleur vert foncé à clair en cercles concentriques	Moyenne
22	10.12. PAS22	Bouira	PDT	Désirée	GN marron + jaunissement	Cercles concentrique marron au centre entouré d'1 ceinture vert clair	Moyenne
23	10.12. PAS23	Bouira	PDT	Spunta	PN sur toute la surface foliaire	Culture homogène vert marron	Abondante
24	10.12. PAS24	Bouira	PDT	Spunta	GN marron + jaunissement	Culture vert clair portant du Mycélium dense cotonneux blanc	Moyenne
25	10.12. PAS25	Bouira	PDT	Spunta	MN marron foncé à contour clair	Mycélium dense couvrant toute la culture	Très faible
26	10.12. PAS26	Bouira	PDT	Balina	GN marron ronde	Vert marron aux bordures vert clair	Moyenne
27	10.12. PAS27	Bouira	PDT	Balina	MN foncé à contour clair	Alternance de couleur marron foncé et vert clair en cercles concentriques	Abondante
28	10.12. PAS28	Bouira	PDT	Fabula	GN marron au centre très clair	Culture homogène vert clair	Moyenne

29	10.12. PAS29	Bouira	PDT	Fabula	GN marron clair au centre + foncé	Culture homogène vert foncé	Moyenne
30	10.12. PAS30	Bouira	PDT	Fabula	MN irrégulière sur toute la surface foliaire	Alternance de couleur de vert foncé et noir en cercles concentriques portant 1 crête mycélienne.	Moyenne
31	10.12. PAS31	Bouira	PDT	Fabula	MN de forme irrégulière	Culture en 2 cercles concentriques, le centre est + foncé que le contour	Faible
32	10.12. PAS32	Bouira	PDT	Fabula	GN marron au centre clair	Culture en 2 cercles concentriques, le centre est + foncé que le contour + crête mycélienne.	Faible
33	10.12. PAS33	Bouira	PDT	Fabula	GN marron + jaunissement	Alternance de couleur marron foncé et vert clair.	Faible
34	10.12. PAS34	Bouira	PDT	Fabula	PN marron clair sur toute la surface foliaire.	Alternance de couleur de vert	Faible
35	29.12. PAS35	Hassi Mamech Mascara	PDT	Désirée	GN ovale marron clair au centre + foncé	Culture homogène vert marron	Absence
36	29.12. PAS36	Hassi Mamech Mascara	PDT	Désirée	GN ovale marron foncé à noir	Culture homogène marron foncé à fond jaunâtre	Absence
37	27.12. TAS37	Stidia Mostaghanem	Tomate	Agora	GN marron + jaunissement	Alternance de couleur vert foncé à noir	Absence
38	16.12. PAS38	Ouled Belhadj Alger	PDT	Spunta	GN marron aux bordures des feuilles	Culture homogène marron portant 1 fine couche mycélienne blanche	Faible
39	16.12. PAS39	Ouled Belhadj Alger	PDT	Spunta	PN noir	Culture homogène marron verdâtre	Faible
40	29.12. TAS40	Hassi Mamèche	Tomate	Agora	GN marron caramel	Alternance de couleur vert et marron + crête mycélienne blanche	Faible
41	27.12. TAS41	Hassi Mamèche	Tomate	Sousana	TPN noir	Culture homogène marron foncé	Faible

42	27.12. TAS42	Hassi Mamèche	Tomate	Sousana	TPN noir + jaunissement	entouré de mycélium. Culture homogène marron + un fond orange	Faible
43	27.12. PAS43	Monador Mostaghanem	PDT	Spunta	GN marron chocolat de forme ronde. 1 seule par feuille	Culture homogène marron foncé	Moyenne
44	29.12. PAS44	Ghris Mascara	PDT	Spunta	TPN marron foncé	Culture homogène verte entouré du mycélium blanc	Forte
45	29.12. PAS45	Tizi Mascara	PDT	Désirée	MN noir + jaunissement	Culture homogène vert marron + crête mycélienne	Moyenne
46	27.12. PAS46	Mostaghanem	PDT	Spunta	MN marron foncé	Culture homogène marron + fond jaunâtre	Absence
47	27.12. PAS47	Mostaganem	PDT	Spunta	PN marron foncé à noir	Culture homogène marron foncé + fond jaunâtre	Moyenne
48	27.12. PAS48	Mostaghanem	PDT	Spunta	PN marron foncé à noir	Culture homogène marron + vert foncé	Absence
49	02.12. PAS49	Rouina Chlef	PDT	Spunta	GN marron ronde + jaunissement	Culture homogène marron foncé + fond orange	Moyenne
50	02.12. PAS50	Rouina Chlef	PDT	Spunta	GN marron foncé	Culture homogène marron foncé + fond jaune	Forte
51	02.12. PAS51	Rouina Chlef	PDT	Spunta	GN marron	Culture homogène marron + mycélium portant des conidies	Forte
52	02.12. PAS52	Rouina	PDT	Spunta	GN marron clair	Culture homogène vert	Pas de spore
53	02.12. PAS53	Rouina	PDT	Spunta	GN noir	Culture homogène marron verdâtre	Moyenne
54	27.12. PAS54	Bourahla Mostaghanem	PDT	Spunta	Plage de PN irrégulière marron clair au centre foncé	Culture homogène vert marron + mycélium portant les conidies	Très forte
55	27.12. PAS55	Bourahla	PDT	Spunta	GN marron foncé ronde	Culture homogènes marron foncé + fond orange	Moyenne
56	27.12. PAS56	Bourahla	PDT	Spunta	GN marron	Culture homogène verte	Forte

57	29.12. PAS57	Ghris Mascara	PDT	Spunta	MN noir	Culture homogène verte + ceinture épaisse mycélienne + fond orange	Moyenne
58	29.12. PAS58	Tizi Matmor Mascara	PDT	Désirée locale	MN marron	Culture homogène marron + fond orange	Moyenne
59	27.12. PAS59	Bourahla	PDT	Spunta	MN marron	Culture homogène vert foncé	Très très forte
60	27.12. PAS60	Bourahla	PDT	Spunta	PN noir	Culture homogène marron	Moyenne
61	27.12. PAS61	Bourahla	PDT	Spunta	TPN noir	Culture homogène verte	Moyenne
62	27.12. TAS62	Stidia	Fruit tomate	Actana S/serre	Pourriture en cercles concentriques noir	Culture homogène marron verdâtre	Absence
63	39.12. PAS63	Ourmes El Oued	PDT	Spunta	GN noir	Culture homogène vert gris. Sporulation exceptionnelle	Moyenne
64	39.12. PAS64	Sahn Essoued	PDT	Spunta	GN marron clair / bordures des feuilles	Culture homogène vert gris conidies transparente	Faible
65	39.12. PAS65	Ourmes	PDT	Spunta	GN marron clair de forme irrégulière	Culture rhizomorphe vert olive + fond jaune. Conidie transparente.	Moyenne
66	39.12. PAS66	Mahr Djaber	PDT	Désirée	GN marron	Culture rhizomorphe vert olive + fond jaune. Conidie transparente.	Faible
67	39.12. PAS67	Bouhmid	PDT	Kuroda	PN noir	Culture homogène vert gris	Faible
68	39.12. PAS68	Bouhmid	PDT	Kuroda	PN noir	Culture en rhizomorphe vert olive	Moyenne
69	39.12. PAS69	Mahr Djaber	PDT	Désirée	GN marron	Culture homogène vert olive + fond jaune	Faible
70	39.12. PAS70	Mahr Djaber	PDT	Spunta	MN miel forme irrégulière	Culture rhizomorphe vert olive	Absence
71	39.12. PAS71	Sahn Gazelle	PDT	Spunta	MN noir	Culture homogène vert olive sporulation aérienne ; conidie transparente	Moyenne

72	39.12. PAS72	Ourmes	PDT	Spunta	TGN marron clair aux nervures à cercles concentriques très clair	Culture homogène vert olive	Absence
73	39.12. PAS73	Hadhoudi	PDT	Spunta	TGN marron clair avec des cercles concentriques	Culture homogène vert olive + fond jaune, sporulation aérienne	Moyenne
74	39.12. PAS74	Sahn Essoued	PDT	Spunta	GN marron clair aux bordures des feuilles	Culture homogène vert gris	Moyenne
75	39.12. PAS75	Ourmes	PDT	Spunta	Plusieurs MN marron foncé / feuille	Culture homogène vert gris	Faible
76	39.12. PAS76	Ourmes	PDT	Spunta	GN noir	Culture homogène vert gris	Faible
77	39.12. PAS77	Sahn Gazelle	PDT	Spunta	MN noir	Culture homogène vert gris	Faible
78	39.12. PAS78	Ourmes	PDT	Spunta	GN marron clair	Culture homogène vert gris	Faible
79	39.12. PAS79	Metiche	PDT	Bartina	GN noir	Culture homogène vert gris	Faible
80	39.12. PAS80	Bouhmid	PDT	Kuroda	PN noir	Culture homogène vert gris	Faible
81	39.12. PAS81	Bouhmid	PDT	Kuroda	MN marron foncé	Culture homogène noir	Très très forte
82	39.12. PAS82	Ourmes	PDT	Spunta	Plusieurs MN marron foncé / feuille	Culture homogène vert gris + fond jaune	Faible
83	39.12. PAS83	Sahn Gazelle	PDT	Désirée	PN noires	Culture en rhizomorphe vert foncé	Forte
84	39.12. PAS84	Trifaoui	PDT	Spunta	GN marron	Culture en rhizomorphe vert foncé	Forte
85	39.12. PAS85	Sahn Gazelle	PDT	Désirée	PN noires	Culture homogène vert olive	Forte
86	39.12. PAS86	Sahn Gazelle	PDT	Fabula	MN marron foncé	Culture homogène vert gris	Très faible

87	39.12. PAS87	Trifaoui	PDT	Bartina	MN marron foncé	Culture homogène vert olive	Forte
88	39.12. PAS88	Mahr Djaber	PDT	Désirée	GN marron	Culture homogène vert olive	Forte
89	39.12. PAS89	Ourmes	PDT	Spunta	GN miel à contour marron foncé	Culture homogène vert olive	Faible
90	39.12. PAS90	Mabrouk Jar Ellah	PDT	Spunta	GN miel	Culture homogène vert olive	Faible
91	39.12. PAS91	Bouhmit	PDT	Spunta	PN miel	Culture homogène marron	Forte
92	39.12. PAS92	Metiche	PDT	Bartina	GN marron clair	Culture homogène marron	Forte
93	16.13.PAS93	INA-Alger	PDT	Echant 1	PN Noir	Culture irrégulière avec pigmentation	Abondante
94	16.13.PAS94	INA-Alger	PDT	Echant 2	GN Marron	Culture homogène en zonation marron et vert	Abondante
95	16.13.PAS95	INA-Alger	PDT	/	PN foncé sur toute la surface de la feuille	Culture homogène	Très faible
96	16.13.PAS96	INA-Alger	PDT	INA3-Beninal	MN marron +pigment	Culture homo.+duvet mycélien blanc milieu pigmenté en rose	Faible
97	16.13.PAS97	INA-Alger	PDT	INA4-Beninal	PN Marron sans pigment	Culture homo très foncé mycélium en bouquet gris	Faible
98	16.13.PAS98	INA-Alger	PDT	INA6-Beninal	MN marron sans pigment	Culture homo vert foncé	Faible
99	16.13.TAS99	Ouled Belhadj	Tomate	/	PN marron foncé + pigment jaune	Culture irrégulière + pigment magenta clair	Absente
100	16.13.TAS100	Ouled Belhadj	Tomate fruit	/	Pourriture noire + duvet blanc	Culture irrégulière + pigment rose	Absente
101	16.13.TAS101	Ouled Belhadj	Tomate fruit	/	Pourriture noire	Culture irrégulière vert foncé + mycélium blanc	Absente

102	16.13.TAS102	ITCMI-Staouéli	Tomate		GN marron avec pigment jaune	Culture homo avec cercle concentrique u dégradé de vert	Absente
103	16.13.TAS103	ITCMI-Staouéli	Tomate	V1	MN marron avec pigment jaune	Culture homo vert avec mycelium dense milieu légèrement pigmenté en jaune	Absente
104	16.14.TAS104	Bordj El Kiffen	Tomate	V5	GN marron dégradé	Culture homogène vert foncé	Absente
105	16.14.TAS105	Bordj El Kiffen	Tomate	/	GN marron dégradé	Culture homogène vert foncé	Absente
106	16.14.TAS106	Bordj El Kiffen	Tomate	/	MN marron	Culture irrégulière vert foncé + mycélium en bouquet et en cristaux	Absente
107	16.14.TAS107	Bordj El Kiffen	Tomate fruit	/	Pourriture noire + duvet blanc	Culture homogène de couleur gris + mycélium blanc dense cotonneux	Absente
108	24.14.PAS108	Djabbala Kh'missi-Guelma	PDT	/	GN marron en cercles concentrique	Culture homogène milieu pugmenté en magenta	Faible
109	42.14.TAS109	Zéralda	Tomate	Koruda	MN marron sans pigment	Culture irrégulière de couleur gris et mycélium en cristaux	Absente
110	42.14.TAS110	Zéralda	Tomate fruit	Salima	Pourriture noire	Culture homogène de couleur gris avec du mycélium en cristaux	Absente
111	42.14.TAS111	Tipaza	Tomate	Salima	MN marron foncé	Culture irrégulière très foncé avec un mycélium dense à la périphérie de la culture	Absente
112	21.14.PAS112	El Harrouch-Skikda	PDT	/	GN irrégulière marron clair au centre foncé	Culture homogène de couleur gris avec du mycélium au centre	Moyenne
113	24.14.TAS113	Bouati Mahmoud-Guelma	Tomate	Spunta	MN noires	Culture homogène en dégradé du clair au foncé + des boules de mycélium en cristaux	moyenne
114	24.14.PAS114	Fedjoudj-Guelma	PDT	Fahla	PN noires	Culture très homogène à 02 zones du clair au foncé + pigment magenta	Faible
115	X.14.PAS115	Ain Bessam	PDT	Désirée	MN marron clair à cercles	Culture homogène vert olive	Faible

116	X.14.PAS116	Ain Bessam	PDT	Bertina	concentriques GN marron + cercles concentriques	Culture homogène vert olive + pigment jaune orange	Faible
117	07.14.TAS117	BouchegrouneI	Tomate	Bertina	GN de forme irrégulière marron foncé avec cercles concentriques	Culture homogène vert olive sans pigment	Absente
118	07.14.TAS118	BouchegrouneI SerreI	Tomate	/	GN de forme irrégulière marron foncé avec cercles concentriques	Culture homogène vert olive sans pigment	Absente
119	07.14.TAS119	Bouchegroune	Tomate	/	MN de forme irrégulière marron foncé	Culture homogène vert olive	Absente
120	07.14.TAS120	Bouchegroune	Tomate	/	MN de forme irrégulière marron foncé + pigment jaune	Culture homogène vert olive+pigment jaune	Absente
121	07.14.TAS121	Bouchegroune	Tomate	/	GN de forme irrégulière marron foncé + pigment jaune	Culture homogène vert olive+pigment jaune	Absente
122	07.14.TAS122	BouchegrouneII	Tomate	/	PN irrégulière foncé légèrement pigmenté en jaune	Culture homogène marron clair avec pigment en orange	Absente
123	07.14.TAS123	BouchegrouneII	Tomate	/	MN irrégulière marron clair	Culture homogène vert bouteille + mycélium blanc	Absente
124	07.14.TAS124	BouchegrouneII	Tomate	/	GN irrégulière clair	Culture homogène +pigment orange foncé	Absente
125	07.14.TAS125	BouchegrouneII	Tomate	/	MN marron foncé	Culture homogène marron+pigment orange clair	Absente
126	07.14.TAS126	BouchegrouneII	Tomate	/	GN marron clair	Culture homogène vert olive +pigment jaune	Absente
127	07.14.TAS127	BouchegrouneII	Tomate	/	PN foncé	Culture homogène vert olive +mycélium gris	Absente
128	07.14.TAS128	BouchegrouneI serreII	Tomate	/	GN marron en cercles concentriques	Culture homogène marron + pigment jaune	Absente
129	07.14.TAS129	BouchegrouneI SerreII	Tomate	/	GN marron en cercles concentriques	Culture homogène vert bouteille	Absente

130	07.14.TAS130	BouhegrouneI	Tomate	/	GN marron en cercles concentriques	Culture homogène+pigment orange foncé	Absente
131	07.14.TAS131	BouhegrouneI	Tomate	/	GN marron en cercles concentriques	Culture homogène vert bouteille foncé	Absente
132	07.14.TAS132	BouhegrouneI	Tomate	/	GN marron en cercles concentriques	Culture homogène +pigment jaune	Absente
133	07.14.TAS133	BouhegrouneI	Tomate	/	GN marron en cercles concentriques	Culture homogène vert olive +pigment orange léger	Absente
134	07.14.TAS134	BouhegrouneI	Tomate	/	GN marron en cercles concentriques	Culture homogène marron foncé au centre avec 1 ceinture mycélienne à la périphérie	Absente
135	07.14.TAS135	BouhegrouneI	Tomate	/	MN marron en cercles concentriques	Culture homogène vert olive	Absente
136	07.14.TAS136	BouhegrouneI	Tomate	/	MN marron en cercles concentriques	Culture homogène vert olive	Absente
137	07.14.TAS137	BouhegrouneI	Tomate	/	GN marron en cercles concentriques	Culture homogène vert foncé au centre et marron à la périphérie	Moyenne
138	07.14.TAS138	BouhegrouneI	Tomate	/	MN marron en cercles concentriques	Culture homogène vert foncé au centre et marron à la périphérie	Forte
139	07.14.TAS139	BouhegrouneI	Tomate	/	MN marron	Culture homogène vert foncé+mycélium en nœud et cristaux	Absente
140	07.14.TAS140	BouhegrouneII	Tomate	/	MN marron	Culture homogène vert clair	Forte
141	07.14.TAS141	Laghrous	Tomate	/	MN marron	Culture homogène verte	moyenne
142	07.14.TAS142	Laghrous	Tomate	/	PN marron foncé	Culture homogène marron + pigment jaune orange	absente
143	07.14.TAS143	Laghrous	Tomate	/	GN marron clair	Culture homogène vert clair +légère pigmentation+mycélium en cristaux	très Faible
144	07.14.TAS144	Lichana	Tomate	Tofan	MN marron		

145	07.14.TAS145	Lichana	Tomate	Tofan	PN marron foncé	Culture homogène vert clair en cercles concentriques et à contour marron clair	moyenne
146	07.14.PAS146	Tipaza	PDT	Tofan	MN marron	Culture homogène vert olive, conidies sans bec transparente	Forte
147	07.14.TAS146	Tipaza	Tomate	Sahara	MN marron	Culture homogène vert olive foncé, conidies foncé avec bec	Forte
148	27.15.TAS148	Mostaghanem	Tomate	Sahara	MN marron	Culture homogène + mycélium dense	Absente
149	27.15.TAS149	Mostaghanem	Tomate	/	MN marron	Culture homogène marron	Absente
150	27.15.TAS150	Mostaghanem	Tomate	Dallel	GN marron foncé sur tige	Culture homogène marron foncé	Absente
151	16.15.AAS151	INA-Alger	Aubergine	/	GN noires	Culture homogène marron au centre et blanche à la périphérie	absente
152	16.15.TAS152	INA-Alger	Tomate	/	Symptôme typique de mildiou	Culture homogène vert clair avec pigment jaune	absente
153	16.15.TAS153	//	//	/	//		Absente
154	16.15.TAS154	//	//	/	//		Absente
155	16.15.TAS155	//	//	/	//		Absente
156	16.15.TAS156	//	//	/	//		Absente

ANNEXE2 : Liste des isolats obtenus représentant les différentes espèces d'*Alternaria* spp. à grandes conidies.

Code	Code souche	Hôte	Lieu d'isolement	Origine (wilaya)	Localisation géographique
DA001	42.12. PA001	PdT	Fouka	Tipaza	Centre
DA002	42.12. PA002	PdT	Fouka -Zirou	Tipaza	Centre
DA003	42.12. PA003	PdT	Fouka marine	Tipaza	Centre
DA004	42.12. PA004	PdT	Zéralda	Tipaza	Centre
DA005	16.12. PA005	PdT	Staouéli-domaine Akouche	Alger	Centre
DA006	16.12. PA006	PdT	Staouéli-domaine 1.0	Alger	Centre
DA007	16.12. PA007	PdT	Staouéli-Ferme N°67	Alger	Centre
DA008	16.12. PA008	PdT	Staouéli-Ferme N°68	Alger	Centre
DA009	16.12. PA009	PdT	Staouéli-Ferme N°69	Alger	Centre
DA010	16.12. PA010	PdT	Staouéli-Ferme N°70	Alger	Centre
DA011	16.12. PA011	PdT	Staouéli-Ferme N°71	Alger	Centre
DA012	16.12. PA012	PdT	Staouéli-Bridja	Alger	Centre
DA013	16.12. PA013	PdT	Staouéli-Bridja Boualem	Alger	Centre
DA014	16.12. PA014	PdT	Staouéli -ITCMI	Alger	Centre
DA015	10.12. PA015	PdT	Djendel	Bouira	Est
DA016	10.12. PA016	PdT	Djendel	Bouira	Est
DA017	10.12. PA017	PdT	Oued Abbas	Bouira	Est
DA018	10.12. PA018	PdT	Oued Abbas	Bouira	Est
DA019	10.12. PA019	PdT	Bouira	Bouira	Est
DA020	10.12. PA020	PdT	Bouira	Bouira	Est
DA021	10.12. PA021	PdT	Bouira	Bouira	Est
DA022	10.12. PA022	PdT	Bouira	Bouira	Est
DA023	10.12. PA023	PdT	Bouira	Bouira	Est
DA024	10.12. PA024	PdT	Bouira	Bouira	Est
DA025	10.12. PA025	PdT	Bouira	Bouira	Est
DA026	10.12. PA026	PdT	Bouira	Bouira	Est
DA027	10.12. PA027	PdT	Bouira	Bouira	Est
DA028	10.12. PA028	PdT	Bouira	Bouira	Est
DA029	10.12. PA029	PdT	Bouira	Bouira	Est
DA030	10.12. PA030	PdT	Bouira	Bouira	Est
DA031	10.12. PA031	PdT	Bouira	Bouira	Est
DA032	10.12. PA032	PdT	Bouira	Bouira	Est
DA033	10.12. PA033	PdT	Bouira	Bouira	Est
DA034	10.12. PA034	PdT	Bouira	Bouira	Est
DA035	29.12. PA035	PdT	Hassi Mamech	Mascara	Ouest
DA036	29.12. PA036	PdT	Hassi Mamech	Mascara	Ouest
DA037	27.12. TA037	Tomate	Stidia	Mostaghanem	Ouest

DA038	16.12. PA038	PdT	Ouled Belhadj	Alger	Centre
DA039	16.12. PA039	PdT	Ouled Belhadj	Alger	Centre
DA040	29.12. TA040	Tomate	Hassi Mamèche	Mascara	Ouest
DA041	27.12. TA041	Tomate	Hassi Mamèche	Mostaghanem	Ouest
DA042	27.12. TA042	Tomate	Hassi Mamèche	Mostaghanem	Ouest
DA043	27.12. PA043	PDT	Monador	Mostaghanem	Ouest
DA044	29.12. PA044	PDT	Ghris	Mascara	Ouest
DA045	29.12. PA045	PDT	Tizi	Mascara	Ouest
DA046	27.12. PA046	PDT	Mostaghanem	Mostaghanem	Ouest
DA047	27.12. PA047	PDT	Mostaghanem	Mostaghanem	Ouest
DA048	27.12. PA048	PDT	Mostaghanem	Mostaghanem	Ouest
DA049	02.12. PA049	PDT	Rouina	Chlef	Ouest
DA050	02.12. PA050	PDT	Rouina	Chlef	Ouest
DA051	02.12. PA051	PDT	Rouina	Chlef	Ouest
DA052	02.12. PA052	PDT	Rouina	Chlef	Ouest
DA053	02.12. PA053	PDT	Rouina	Chlef	Ouest
DA054	27.12. PA054	PDT	Bourahla	Mostaghanem	Ouest
DA055	27.12. PA055	PDT	Bourahla	Mostaghanem	Ouest
DA056	27.12. PA056	PDT	Bourahla	Mostaghanem	Ouest
DA057	29.12. PA057	PDT	Ghris	Mascara	Ouest
DA058	29.12. PA058	PDT	Tizi Matmor	Mascara	Ouest
DA059	27.12. PA059	PDT	Bourahla	Mostaghanem	Ouest
DA060	27.12. PA060	PDT	Bourahla	Mostaghanem	Ouest
DA061	27.12. PA061	PDT	Bourahla	Mostaghanem	Ouest
DA062	27.12. TA062	Tomate	Stidia	Mostaghanem	Ouest
DA063	39.12. PA063	PdT	Ourmes	El Oued	Sud
DA064	39.12. PA064	PdT	Sahn Essoued	El Oued	Sud
DA065	39.12. PA065	PdT	Ourmes	El Oued	Sud
DA066	39.12. PA066	PdT	Mahr Djaber	El Oued	Sud
DA067	39.12. PA067	PdT	Bouhmid	El Oued	Sud
DA068	39.12. PA068	PdT	Bouhmid	El Oued	Sud
DA069	39.12. PA069	PdT	Mahr Djaber	El Oued	Sud
DA070	39.12. PA070	PdT	Mahr Djaber	El Oued	Sud
DA071	39.12. PA071	PdT	Sahn Gazelle	El Oued	Sud
DA072	39.12. PA072	PdT	Ourmes	El Oued	Sud
DA073	39.12. PA073	PdT	Hadhoudi	El Oued	Sud
DA074	39.12. PA074	PdT	Sahn Essoued	El Oued	Sud
DA075	39.12. PA075	PdT	Ourmes	El Oued	Sud
DA076	39.12. PA076	PdT	Ourmes	El Oued	Sud
DA077	39.12. PA077	PdT	Sahn Gazelle	El Oued	Sud

DA078	39.12. PA078	PdT	Ourmes	El Oued	Sud
DA079	39.12. PA079	PdT	Metiche	El Oued	Sud
DA080	39.12. PA080	PdT	Bouhmid	El Oued	Sud
DA081	39.12. PA081	PdT	Bouhmid	El Oued	Sud
DA082	39.12. PA082	PdT	Ourmes	El Oued	Sud
DA083	39.12. PA083	PdT	Sahn Gazelle	El Oued	Sud
DA084	39.12. PA084	PdT	Trifaoui	El Oued	Sud
DA085	39.12. PA085	PdT	Sahn Gazelle	El Oued	Sud
DA086	39.12. PA086	PdT	Sahn Gazelle	El Oued	Sud
DA087	39.12. PA087	PdT	Trifaoui	El Oued	Sud
DA088	39.12. PA088	PdT	Mahr Djaber	El Oued	Sud
DA089	39.12. PA089	PdT	Ourmes	El Oued	Sud
DA090	39.12. PA090	PdT	Mabrouk Jar Ellah	El Oued	Sud
DA091	39.12. PA091	PdT	Bouhmit	El Oued	Sud
DA092	39.12. PA092	PdT	Metiche	El Oued	Sud
DA093	16.13. PA093	PdT	ENSA-Echnat 1	Alger	Centre
DA094	16.13. PA094	PdT	ENSA-Echnat 2	Alger	Centre
DA095	16.13. PA095	PdT	ENSA-Echnat 3	Alger	Centre
DA096	16.13. PA096	PdT	ENSA-Beninal 3	Alger	Centre
DA097	16.13. PA097	PdT	ENSA-Beninal 4	Alger	Centre
DA098	16.13. PA098	PdT	ENSA-Beninal 6	Alger	Centre
DA099	16.13. TA099	Tomate	Ouled Belhadj	Alger	Centre
DA100	16.13. TA100	Tomate	Ouled Belhadj	Alger	Centre
DA101	16.13. TA101	Tomate	Ouled Belhadj	Alger	Centre
DA102	16.13. TA102	Tomate	ITCMI-Staouéli	Alger	Centre
DA103	16.13. TA103	Tomate	ITCMI-Staouéli	Alger	Centre
DA104	16.14. TA104	Tomate	Bordj El Kiffen	Alger	Centre
DA105	16.14. TA105	Tomate	Bordj El Kiffen	Alger	Centre
DA106	16.14. TA106	Tomate	Bordj El Kiffen	Alger	Centre
DA107	16.14. TA107	Tomate	Bordj El Kiffen	Alger	Centre
DA108	24.14. PA108	PdT	Djabbala Kh'missi	Guelma	Est
DA109	42.14. TA109	Tomate	Zéralda	Tipaza	Centre
DA110	42.14. TA110	Tomate	Zéralda	Tipaza	Centre
DA111	42.14. TA111	Tomate	Tipaza	Tipaza	Centre
DA112	21.14. PA112	PdT	El Harrouch	Skikda	Est
DA113	24.14. TA113	Tomate	Bouati Mahmoud	Guelma	Est
DA114	24.14. PA114	PdT	Fedjoudj	Guelma	Est
DA115	10.14. PA115	PdT	Ain Bessam	Bouira	Est
DA116	10.14. PA116	PdT	Ain Bessam	Bouira	Est
DA117	07.14. TA117	Tomate	BouchegrouneI	Biskra	Sud

DA118	07.14. TA118	Tomate	BouchegrouponneI-serre1	Biskra	Sud
DA119	07.14. TA119	Tomate	Bouchegrouponne	Biskra	Sud
DA120	07.14. TA120	Tomate	Bouchegrouponne	Biskra	Sud
DA121	07.14. TA121	Tomate	Bouchegrouponne	Biskra	Sud
DA122	07.14. TA122	Tomate	BouchegrouponneII	Biskra	Sud
DA123	07.14. TA123	Tomate	BouchegrouponneII	Biskra	Sud
DA124	07.14. TA124	Tomate	BouchegrouponneII	Biskra	Sud
DA125	07.14. TA125	Tomate	BouchegrouponneII	Biskra	Sud
DA126	07.14. TA126	Tomate	BouchegrouponneII	Biskra	Sud
DA127	07.14. TA127	Tomate	BouchegrouponneII	Biskra	Sud
DA128	07.14. TA128	Tomate	BouchegrouponneI-serre2	Biskra	Sud
DA129	07.14. TA129	Tomate	BouchegrouponneI-serre 2	Biskra	Sud
DA130	07.14. TA130	Tomate	BouchegrouponneI	Biskra	Sud
DA131	07.14. TA131	Tomate	BouchegrouponneI	Biskra	Sud
DA132	07.14. TA132	Tomate	BouchegrouponneI	Biskra	Sud
DA133	07.14. TA133	Tomate	BouchegrouponneI	Biskra	Sud
DA134	07.14. TA134	Tomate	BouchegrouponneI	Biskra	Sud
DA135	07.14. TA135	Tomate	BouchegrouponneI	Biskra	Sud
DA136	07.14. TA136	Tomate	BouchegrouponneI	Biskra	Sud
DA137	07.14. TA137	Tomate	BouchegrouponneI	Biskra	Sud
DA138	07.14. TA138	Tomate	BouchegrouponneI	Biskra	Sud
DA139	07.14. TA139	Tomate	BouchegrouponneI	Biskra	Sud
DA140	07.14. TA140	Tomate	BouchegrouponneII	Biskra	Sud
DA141	07.14. TA141	Tomate	Laghrous	Biskra	Sud
DA142	07.14. TA142	Tomate	Laghrous	Biskra	Sud
DA143	07.14. TA143	Tomate	Laghrous	Biskra	Sud
DA144	07.14. TA144	Tomate	Lichana	Biskra	Sud
DA145	07.14. TA145	Tomate	Lichana	Biskra	Sud
DA146	42.14. PA146	PdT	Tipaza	Tipaza	Centre
DA147	42.14. TA147	Tomate	Tipaza	Tipaza	Centre
DA148	27.15. TA148	tomate	Mostaghanem	Mostaghanem	Ouest
DA149	27.15. TA149	tomate	Mostaghanem	Mostaghanem	Ouest
DA150	27.15. TA150	tomate	Mostaghanem	Mostaghanem	Ouest
DA151	16.15. AA151	Aubergine	ENSA	Alger	Centre
DA152	16.15. TA152	Tomate	ENSA	Alger	Centre
DA153	16.15. TA153	Tomate	ENSA	Alger	Centre
DA154	16.15. TA154	Tomate	ENSA	Alger	Centre
DA155	16.15. TA155	Tomate	ENSA	Alger	Centre
DA156	16.15. TA156	Tomate	ENSA	Alger	Centre

ANNEXE 3

Aspect cultural des différentes souches d'*Alternaria* spp

Isolat	Aspect du mycélium	Conidiophore	Forme de la colonie	Pigmentation	Zone concentrique
DA001	sub aérien en cristal dense cotonneux	Conidiophore pigmenté s/f de spores	irrégulière	magenta	Absence de zone concentrique
DA002	aérien gris dense	conidiophores très ramifiés pigmenté	irrégulière	jaune	Absence de zone concentrique
DA003	dense cotonneux	Conidiophore pigmenté s/f de spores	légrement irrégulière	jaune	Zone concentrique en vert dégradé
DA006	blanc dense cotonneux	conidiophores s/f d'étoile d'araignée	irrégulière	jaune foncé	Absence de zone concentrique
DA008	aérien blanc en bouquet	conidiophore très longs pigmentés	circulaire	orange	Absence de zone concentrique
DA007	gris compact	conidiophores pigmentés s/f de longues spores	irrégulière	/	Absence de zone concentrique
DA009	sub aérien gris clair	conidiophores pigmentés s/f de longues spores	circulaire	jaune	Absence de zone concentrique
DA011	en battonnet évoluant en hauteur	conidiophores pigmentés s/f de longues spores	circulaire	jaune	Zone concentrique en vert dégradé
DA014	sub aérien gris clair dense	conidiophores très ramifiés pigmenté	légrement irrégulière	/	Zone concentriques
DA019	aérien blanc		circulaire	/	Absence de zone concentrique
DA025	cotonneux gris	conidiophores pigmentés s/f de longues spores	légrement irrégulière	/	Absence de zone concentrique
DA038	masse cotonneuse dense blanc	conidiophores très ramifiés pigmenté	circulaire	/	Zone concentriques
DA040	duveteux gris clair	conidiophores très ramifiés pigmenté	irrégulière	jaune	Zone concentriques
DA044	dense cotonneux blanc		irrégulière	jaune	Absence de zone concentrique
DA047	blanc à grs dense		irrégulière	jaune foncé	Absence de zone concentrique
DA050	cotonneux dense	conidiophores s/f d'étoile d'araignée	irrégulière	jaune	zone concentriques
DA052	duveteux compact gris clair	conidiophores pigmentés s/f de longues spores	circulaire	/	en zone concentrique
DA054	aérien blanc	conidiophores très ramifiés pigmenté	légrement irrégulière	jaune clair	en zone concentrique
DA057	dence cotonneux blanc	conidiophores évoluant en hauteur	circulaire	jaune foncé	en zone concentrique
DA060	duveteux blanc	conidiophores s/f d'étoile d'araignée	circulaire	/	Absence de zone concentrique
DA062	ras	conidiophores s/f d'étoile d'araignée	légrement irrégulière	/	en zone concentrique
DA082	duveteux blanc	conidiophores s/f d'étoile d'araignée	légrement irrégulière	/	Absence de zone concentrique
DA086	subaérien dense	conidiophores pigmentés s/f de longues spores	circulaire	/	Absence de zone concentrique
DA090	subaérien	conidiophores s/f d'étoile d'araignée	légrement irrégulière	/	Absence de zone concentrique
DA094	ras		circulaire	jaune	en zone concentrique
DA099	cotonneux en bouquet	conidiophores pigmentés s/f de longues spores	circulaire	/	en zone concentrique
DA100	cotonneux blanc dense en cristal	conidiophores très longs pigmentés	circulaire	jaune clair	en zone concentrique
DA101	masse cotonneuse dense blanc	conidiophores s/f d'étoile d'araignée	circulaire	/	Absence de zone concentrique

DA109	aérien cotonneux blanc dense	conidiophores s/f d'étoile d'araignée	circulaire	/	Absence de zone concentrique
DA111	duveteux gris		irrégulière	/	en zone concentrique
DA113	aérien cotonneux blanc dense		circulaire	/	Absence de zone concentrique
DA114	duveteux blanc		circulaire	/	Absence de zone concentrique
DA119	en bouquets cristaux		circulaire	orange foncé	Absence de zone concentrique
DA136	duveteux gris		irrégulière	orange	Absence de zone concentrique
DA140	sub aérien gris clair		circulaire	jaune	en zone concentrique
DA141	duveteux gris clair et blanc		circulaire	orange foncé	Absence de zone concentrique
DA145	cotonneux gris	conidiophores pigmentés s/f de longues sp	irrégulière	jaune foncé	Absence de zone concentrique
DA147	duveteux gris clair		circulaire	/	Absence de zone concentrique
DA152	cotonneux en bouquet	conidiophores pigmentés s/f de longues sp	circulaire	/	en zone concentrique
DA153	ras	conidiophores s/f d'étoile d'araignée	circulaire	orange clair	en zone concentrique
DA154	cotonneux dense	conidiophores s/f d'étoile d'araignée	irrégulière	jaune	zone concentriques
DA155	sub aérien gris clair		irrégulière	jaune	en zone concentrique
DA156	cotonneux dense	conidiophores s/f d'étoile d'araignée	irrégulière	jaune	zone concentriques

ANNEXE 4 : Identification préliminaire des isolats d'*Alternaria* spp à grandes conidies.

Isolat	espèce	Hôte	Origine géographique (Climat) ^b	PCR OATF4/OAT R2	PCR OAsF7/OAsR 6	PCR RFLP Profile ^a	CAL	RPB2
DA001	<i>A.linariae</i>	Pomme de terre	Tipaza	+	-	ND	MH243795	
DA002	<i>A.linariae</i>	Pomme de terre	Tipaza	+	-	ND	MH243769	
DA003	<i>A.linariae</i>	Pomme de terre	Tipaza	+	-	ND	MH243793	
DA005	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Alger	-	+	S		
DA006	<i>A.linariae</i>	Pomme de terre	Alger	+	-	ND	MH243789	
DA007	<i>A.linariae</i>	Pomme de terre	Alger	+	-	ND	MH243794	
DA008	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Alger	-	+	S	MH243805	MH243818
DA009	<i>A.grandis</i>	Pomme de terre	Alger	-	+	?	MH243790	
DA010	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Alger	-	+	S		
DA011	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Alger	-	+	S	MH243806	MH243820
DA012	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Alger	-	+	S		
DA013	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Alger	-	+	S		
DA014	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Alger	-	+	S	MH243796	
DA015	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA016	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA017	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA018	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA019	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S	MH243808	MH243822
DA020	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA021	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA022	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA025	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S	MH243786	MH243823

DA026	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA028	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA029	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA030	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA031	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA032	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA033	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA034	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA035	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Mascara	-	+	S		
DA036	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Mascara	-	+	S		
DA037	<i>A.linariae</i>	Tomate	Mostaghanem	+	-	ND		
DA038	<i>A.grandis</i>	Pomme de terre	Alger	-	+	G	MH243770	
DA039	<i>A.linariae</i>	Pomme de terre	Alger	+	-	ND		
DA040	<i>A.linariae</i>	Tomate	Mascara	+	-	ND	MH243792	
DA041	<i>A.linariae</i>	Tomate	Mostaghanem	+	-	ND		
DA042	<i>A.linariae</i>	Tomate	Mostaghanem	+	-	ND		
DA043	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Mostaghanem	-	+	S		
DA045	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Mascara	-	+	S		
DA046	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Mostaghanem	-	+	S		
DA047	<i>A.grandis</i>	Pomme de terre	Mostaghanem	-	+	G	MH243771	
DA048	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Mostaghanem	-	+	S		
DA049	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Chlef	-	+	S		
DA050	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Chlef	-	+	S	MH243772	MH243809
DA051	<i>A.grandis</i>	Pomme de terre	Chlef	-	+	G		
DA052	<i>A.grandis</i>	Pomme de terre	Chlef	-	+	G	MH243773	
DA053	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Chlef	-	+	S		
DA054	<i>A.grandis</i>	Pomme de terre	Mostaghanem	-	+	G	MH243774	

DA055	<i>A.grandis</i>	Pomme de terre	Mostaghanem	-	+	G		
DA056	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Mostaghanem	-	+	S		
DA057	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Mascara	-	+	?	MH243791	MH243819
DA058	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Mascara	-	+	S		
DA059	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Mostaghanem	-	+	S		
DA060	<i>A.grandis</i>	Pomme de terre	Mostaghanem	-	+	G	MH243775	
DA061	<i>A.grandis</i>	Pomme de terre	Mostaghanem	-	+	G		
DA062	<i>A.protenta</i>	Tomate	Mostaghanem	-	+	S	MH243797	MH243810
DA063	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA064	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA065	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA066	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA067	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA068	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA069	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA070	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA071	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA072	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA073	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA074	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA075	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA076	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA077	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA078	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA079	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA080	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA081	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		

DA082	<i>A.protenta</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	?	KX870505	KX870507
DA083	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA084	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA085	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA086	<i>A.protenta</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S	KX870506	KX870508
DA087	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA088	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA089	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA090	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S	MH243776	MH243811
DA091	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA092	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	El Oued	-	+	S		
DA093	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Alger	-	+	S		
DA094	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Alger	-	+	S	MH243798	MH243812
DA096	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Alger	-	+	S		
DA097	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Alger	-	+	S		
DA098	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Alger	-	+	S		
DA099	<i>A.grandis</i>	Tomate	Alger	-	+	G	MH243777	
DA100	<i>A.linariae</i>	Tomate	Alger	+	-	ND	MH243807	
DA101	<i>A.linariae</i>	Tomate	Alger	+	-	ND	MH243778	
DA102	<i>A.linariae</i>	Tomate	Alger	+	-	ND		
DA103	<i>A.linariae</i>	Tomate	Alger	+	-	ND		
DA104	<i>A.linariae</i>	Tomate	Alger	+	-	ND		
DA107	<i>A.linariae</i>	Tomate	Alger	+	-	ND		
DA108	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Guelma	-	+	S		
DA109	<i>A.linariae</i>	Tomate	Tipaza	+	-	ND	MH243779	
DA110	<i>A.linariae</i>	Tomate	Tipaza	+	-	ND		
DA111	<i>A.linariae</i>	Tomate	Tipaza	+	-	ND	MH243780	

DA112	<i>A.linariae</i>	Pomme de terre	Skikda	+	-	ND		
DA113	<i>A.solani</i>	Tomate	Guelma	-	+	S	MH243799	MH243821
DA114	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Guelma	-	+	?	MH243788	MH243813
DA115	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA116	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Bouira	-	+	S		
DA117	<i>A.linariae</i>	Tomate	Biskra	+	-	ND		
DA118	<i>A.linariae</i>	Tomate	Biskra	+	-	ND		
DA119	<i>A.linariae</i>	Tomate	Biskra	+	-	ND	MH243800	
DA120	<i>A.linariae</i>	Tomate	Biskra	+	-	ND		
DA121	<i>A.linariae</i>	Tomate	Biskra	+	-	ND		
DA122	<i>A.linariae</i>	Tomate	Biskra	+	-	ND		
DA123	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S		
DA124	<i>A.linariae</i>	Tomate	Biskra	+	-	ND		
DA125	<i>A.linariae</i>	Tomate	Biskra	+	-	ND		
DA126	<i>A.linariae</i>	Tomate	Biskra	+	-	ND		
DA127	<i>A.linariae</i>	Tomate	Biskra	+	-	ND		
DA128	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S		
DA129	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S		
DA130	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S		
DA131	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S		
DA132	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S		
DA133	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S		
DA134	<i>A.linariae</i>	Tomate	Biskra	+	-	ND		
DA135	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S		
DA136	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S	MH243801	MH243814
DA137	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S		
DA138	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S		

DA139	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S		
DA140	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S	MH243802	MH243815
DA141	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S	MH243803	MH243816
DA142	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S	MH243804	MH243817
DA143	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S		
DA144	<i>A.linariae</i>	Tomate	Biskra	+	-	ND		
DA145	<i>A.solani</i>	Tomate	Biskra	-	+	S		
DA146	<i>A.solani</i>	Pomme de terre	Tipaza	-	+	S		
DA147	<i>A.linariae</i>	Tomate	Tipaza	+	-	ND	MH243781	
DA148	<i>A.linariae</i>	Tomate	Mostaghanem	+	-	ND		
DA149	<i>A.linariae</i>	Tomate	Mostaghanem	+	-	ND		
DA150	<i>A.linariae</i>	Tomate	Mostaghanem	+	-	ND		
DA152	<i>A.grandis</i>	Tomate	Alger	-	+	G	MH243782	
DA153	<i>A.linariae</i>	Tomate	Alger	+	-	ND	MH243783	
DA154	<i>A.grandis</i>	Tomate	Alger	-	+	?	MH243787	
DA155	<i>A.grandis</i>	Tomate	Alger	-	+	G	MH243784	
DA156	<i>A.grandis</i>	Tomate	Alger	-	+	G	MH243785	

Publications scientifiques internationales



A.grandis 47 (G03)



Citation: Ayad D., Aribi D., Hamon B., Kedad A., Simoneau P., Bouznad Z. (2019) Distribution of large-spored *Alternaria* species associated with early blight of potato and tomato in Algeria. *Phytopathologia Mediterranea* 58(1): 139-149. doi: 10.13128/Phytopathol_Mediterr-23988

Accepted: November 19, 2018

Published: May 15, 2019

Copyright: © 2019 Ayad D., Aribi D., Hamon B., Kedad A., Simoneau P., Bouznad Z. This is an open access, peer-reviewed article published by Firenze University Press (<http://www.fupress.com/pm>) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Competing Interests: The Author(s) declare(s) no conflict of interest.

Editor: Vladimiro Guarnaccia, University of Torino, Italy.

Research Papers

Distribution of large-spored *Alternaria* species associated with early blight of potato and tomato in Algeria

DJIDA AYAD^{1,2,*}, DJIHAD ARIBI¹, BRUNO HAMON², ABDELAZIZ KEDAD¹, PHILIPPE SIMONEAU², ZOUAOU BOUZNAD¹

¹ ENSA-El Harrach, Laboratoire de Phytopathologie et Biologie Moléculaire. Algiers, Algeria

² UMR 1345 IRHS, Université d'Angers-INRA-Agrocampus Ouest, SFR QUASAV, 42 Rue G. Morel, F-49071 Beaucozéz, France

*Corresponding author: medaydji@gmail.com

Abstract. Potato and tomato are important crops in Algerian agriculture, and both are threatened by abiotic and biotic stresses, and early blight is a major disease affecting both crops. Surveys carried out from 2012 to 2015 in 12 major growing regions for these crops yielded a total of 247 *Alternaria* isolates having morphological and cultural characteristics of sections *Alternaria* and *Porri*. Since early blight symptoms and morphological characteristics of the isolates did not allow sharp distinction between the different large-spored species of *Alternaria*, the isolates in section *Porri*, often considered primary causes of the diseases, were selected for molecular characterization by diagnostic PCR using specific primers. This allowed species identification of 147 *Alternaria* isolates as *A. solani*, *A. protenta*, *A. grandis* or *A. linariae*. These species were present on potato and tomato crops at varying frequencies, depending on the hosts and on bioclimatic locations. Pathogenicity tests for the four species, on detached leaflets and whole seedlings, showed that all were pathogenic to potato and tomato, with varying virulence. These results suggest that parasitic specialization of these *Alternaria* species on solanaceous plants should be reconsidered.

Keywords. Solanaceous crops, parasitic specialization, prevalence.

INTRODUCTION

Potato (*Solanum tuberosum* L.) and tomato (*S. lycopersicum* L.) are important crops grown in Algeria. They are distributed differently in the various bioclimatic zones of the country, and are grown with different cultural practices. Potato crops occupy significant area in several regions of Algeria, from north (Ain Defla) to south (El Oued), and from east (Skikda, Guelma) to west (Mostaganem, Mascara). Tomato, however, is mainly cultivated in the northern part of the country, less extensively and mostly in plastic houses, as in the Biskra region. Both crops are often cultivated side by side or follow one another in rotations for several years, in many coastal regions of the

country. Intensification of these two crops without compliance to good agricultural practices led to the development of important diseases caused by fungi and oomycetes, including early blight and late blight.

The first reference mentioning *A. solani* Sorauer (= *Macrosporium solani* Ellis & G. Martin) as a pathogen causing potato leaf blight was that of Galloway (1891) in Australia. Chester (1892) then reported this pathogen in the United States of America, other solanaceous cultivated plants (Van der Waals *et al.*, 2001; Odilbekov, 2015). A few years later, *A. solani* and *A. alternata* (Fr.) Keissl. were identified on potato leaves but *A. alternata* was considered first as saprophytic (Jones and Grout, 1897). It was not until 1984 that *A. alternata* was recognized as pathogenic on several solanaceous plants (Droby *et al.* 1984). The name “early blight” for the disease caused by *A. solani* was coined by Jones (1893) to distinguish this from late blight. The symptoms of the early blight appear on the leaves as dark, elongated or circular lesions each with concentric rings surrounded by a yellow halo.

On the basis of cultural techniques and morphological characteristics of the conidia (size and beak length), Simmons (2000, 2007) described several new *Alternaria* species on *Solanaceae*, that may be responsible for early blight on potato and tomato. Thus, new species were described, which are morphologically very similar to *A. solani*. These include *A. grandis* E.G. Simmons on *S. tuberosum*, *A. tomatophila* E.G. Simmons on *S. lycopersicum*, *A. cretica* E.G. Simmons & Vakal. On *S. lycopersicum* var. *esculentum*, and *A. subcylindrica* E.G. Simmons & R.G. Roberts on *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*.

More recently, molecular and genomics techniques applied to *Alternaria* allowed redefinition of various species with large conidia commonly isolated from *Solanaceae*, and considered as the primary causes of early blight. Woudenberg *et al.* (2014), by synonymizing *A. linariae* (Neerg.) E.G. Simmons with *A. cretica* E.G. Simmons & Vakal., *A. cucumericola* E.G. Simmons & C.F. Hill, *A. subcylindrica*, *A. tabasco* E.G. Simmons & R.G. Roberts, and *A. tomatophila*, have expanded the host range of *A. linariae* to *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, and *Scrophulariaceae*. *Alternaria linariae*, a common pathogen of tomato, was also reported on potato during surveys carried out in Algeria (Ayad *et al.*, 2018). *Alternaria Grandis*, which was confused for a long time with *A. solani*, has been regularly reported in many countries on potato (Lourenço *et al.*, 2009; Cardoso, 2014; Bessadat *et al.*, 2016; Landschoot *et al.*, 2017). *Alternaria grandis* was also recently isolated from tomato (Bessadat *et al.*, 2017) in the northwest of Algeria. *Alternaria protenta*, which is closely related to *A. solani* and whose host range was extended to *Asteraceae*, *Euphorbiaceae*, *Gramineae* and

Solanaceae by Woudenberg *et al.* (2014), was recently detected on potato in Belgium (Landschoot *et al.*, 2017) and in Algeria (Ayad *et al.*, 2017).

The aims of the present study were, firstly, to identify at the species level the large-spored *Alternaria* isolates obtained from surveys carried out during three cropping years on different potato and tomato fields across the main bioclimatic areas of Algeria. Since early blight symptoms and the morphological characteristics of the isolates do not allow distinction between the different large-spored *Alternaria* spp., specific identification of the isolates was based on PCR techniques. The second objective was to assess the aggressiveness of isolates on their respective potato and tomato hosts, and to clarify the parasitic specialization of replace by large-spored *Alternaria* species by artificial cross inoculations *in vitro* and under conditions similar to those occurring in the field.

MATERIALS AND METHODS

Surveys and sampling

Surveys were carried in 60 locations across 12 regions in Algeria, with different cropping systems (fields and greenhouses). Three to four plots were sampled in each region during three successive cropping years: 2012–2013, 2013–2014 and 2014–2015. The majority of the localities were selected from the main potato- and tomato-producing regions represented by different bioclimatic areas of Algeria: Mediterranean climate (Algiers, Tipaza, Guelma and Skikda), semi-arid climate (Mostaganem, Chlef, Mascara, Ain Defla and Bouira), and arid climate (Laghouat, Biskra and El Oued) (Figure 1). Sampling was carried out from potato and tomato plant organs showing the typical symptoms of early blight: 164 isolates were collected from potato leaves essentially and 83 from leaves, stems and fruits of tomato.

Isolation, purification and conservation of isolates

Isolations were performed according to the method of Van der Waals *et al.* (2004). Small tissue pieces (3 to 4 mm²) were cut from individual lesion edges, disinfected in 1% active NaOCl for 3 min, washed twice in sterile distilled water, and then dried with absorbent sterile paper. Four pieces of tissues were plated on individual Petri plates containing Potato Dextrose Agar (PDA), and these were incubated at 22°C under continuous light for 1 to 2 weeks. The purification of the *Alternaria* spp. isolates as single conidium cultures was car-

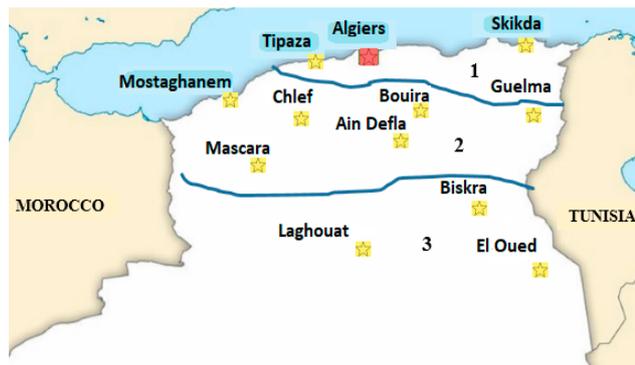


Figure 1. Geographic localities in the different bioclimatic areas: 1 = Mediterranean climate, 2 = semi-arid climate, 3 = arid climate

ried out between the 3rd and the 5th day of incubation. Plates containing the single conidium cultures were then placed under near-UV (12h dark and 12h light) to induce sporulation and allow further morphological characterization.

Single conidium cultures for short-term use were grown in Petri dishes containing a PDA for 12 d then stored at 4°C. For medium term use, 12-d-old PDA cultures in test tubes were stored at 4°C. For long term use, mycelium/agar plugs (8 mm diam.) were stored at 80°C in cryotubes containing sterile glycerol (30% w/w).

Identification of the large-spored Alternaria species using molecular markers

On the basis of the cultural and the morphological characteristics, 155 isolates with large conidia (out of a total 247 isolates) were selected for molecular characterization by PCR using specific primers, for analysis of genomic DNA by PCR/RFLP, using double enzymatic digestion of a portion of the calmodulin gene and sequencing the calmodulin and the RPB2 genes. Isolates were grown on PDA medium at room temperature for 10 d. Total genomic DNA from fungal samples was extracted according to the method described by Goodwin and Lee (1993). The DNA extracts of the 155 isolates were amplified using two sets of specific primer pairs to differentiate between *A. linariae* and *A. solani* and related species (*A. grandis* and *A. protenta*) (Gannibal *et al.*, 2014). The primer pair OasF7 and OasR6 amplified a 164 bp fragment from the Alt a1 gene of *A. solani*, *A. grandis* and *A. protenta*, and the primer pair OatF4 and OatR2 amplified a 438 pb fragment from the calmodulin encoding gene of *A. linariae*. The PCR conditions were as described by Gannibal *et al.* (2014). To differentiate between *A. grandis* and *A. solani sensu lato* (i.e. includ-

ing *A. protenta*), a portion of the calmodulin gene was amplified from the isolates that each gave a positive signal with the primer pair OasF7 – OasR6 using the primer pair CALDF1 / CALDR1 (Lawrence *et al.*, 2013). The resulting PCR products were double digested with the restriction enzymes *RsaI* and *HaeII*. The digestion products were then separated by electrophoresis in 2% agarose gels and visualized under UV light after staining with ethidium bromide. Predicted restriction patterns mainly differed by the size of the larger fragment, i.e. 420 bp for *A. solani sensu lato* and 292 bp for *A. grandis* (Figure 2). Identification of the *Alternaria* species was validated by sequencing the fragment of the calmodulin locus amplified as described above from 42 isolates. To confirm the presence of *A. protenta*, a portion of the RPB2 locus was amplified from the isolates identified as *A. solani* based on their calmodulin sequence, using the primer pair RPB2-5F2 (Sung *et al.*, 2007) and RPB2-7cR (Liu *et al.*, 1999), and the resulting PCR product was sequenced. Sanger sequencing was performed by GATC Biotech. Sequence analyses were carried out using the Phylogeny.fr web service (Dereeper *et al.*, 2008). Multiple sequence alignments were generated with MUSCLE and curated using the Gblocks algorithm. Maximum likelihood (ML) analyses were performed with PhyML. The robustness of the ML topologies was evaluated using the Shimodaira-Hasegawa (SH)-like test for branches.

Pathogenicity tests of large-spored Alternaria species on their respective hosts

To confirm pathogenicity of isolates, inoculations onto detached leaflets and whole plants were performed on susceptible varieties of tomato (cv. Marmande) and

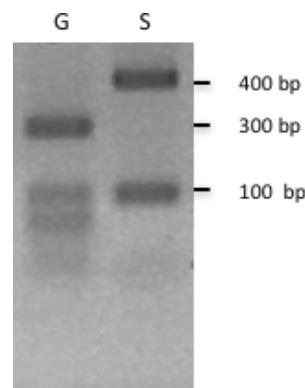


Figure 2. Typical restriction patterns obtained by double digestion of PCR product corresponding to a portion of the calmodulin gene from *A. solani* and *A. grandis*. Size of the larger fragment, 420 bp for *A. solani sensu lato* (S) and 292 bp for *A. grandis* (G)

potato (cv. Spunta). These isolates were selected for their ability to produce conidia. Conidium suspensions were prepared from 15-d-old cultures. The final concentration of the suspensions was adjusted to 10^4 conidia mL^{-1} . The inoculations were performed by depositing drops (20 μL each) on detached leaflets or by spraying suspensions onto whole plants. Disease severity was evaluated at 15 d –post-inoculation, using a visual rating scale from 1 to 9 expressing the extension of necrosis CIP (International Potato Center) (2008).

RESULTS

Characterization of the large-spored Alternaria species according to early blight symptoms on potato and tomato

Isolation from plant samples showing typical early blight symptoms yielded 247 isolates (164 from potato and 83 from tomato). On the basis of the cultural and morphological characteristics of the colonies and conidia, the isolates were divided in three groups. The first (Group A: 92 isolates) included all the isolates with abundant conidium production and small catenulate conidia and identified as species belonging to section *Alternaria*. The second (Group B: 92 isolates) contained all isolates producing large solitary beaked conidia, related to species belonging to the section *Porri*. The third (Group C: 63 isolates) consisted of large-spored isolates that only formed sterile mycelium after culture purification. In relation to the host plants, 89% of the isolates belonging to the section *Porri* originated from potato, and 73% of the non-sporulating isolates originated from tomato. No correlation was found between the presence of yellow halos on symptomatic leaves and the production of a diffusible pigment on growth medium by the isolates from the diseased samples. Similarly, the various forms of symptoms generated colonies producing either large or small conidia. Thus, there was no relationships between necrosis size (small, medium or large necrotic lesions), the types of the colonies in culture medium (sporulating or non-sporulating) and the conidium types (large solitary or small catenulate conidia).

Molecular characterization and identification of large-spored Alternaria species

Given the very similar morphological characteristics of the conidia, and the difficulty to distinguish the different *Alternaria* species within the section *Porri*, molecular markers and DNA-sequencing were used for their identification. The small-spored isolates (Group

A) were not included in this examination. The three molecular approaches allowed clear species identification for 147 of 155 isolates from Groups B and C, while eight isolates could not be identified due to problems in DNA extraction and amplification at the selected loci (Table 1). Preliminary tests were carried out for the identification of the 147 isolates using two pairs of specific primers that differentiate *A. solani*, *A. protenta* and *A. grandis* (OasF7/OasR6) from *A. linariae* (OATF4/OATR2). All the tested isolates generated positive signals with one of the two primer pairs, confirming the presence of these species on potato and tomato crops in Algeria. In this analysis, 37 isolates including seven from potato and 30 from tomato, were identified as *A. linariae* by amplification of the 438 pb from the gene encoding for calmodulin (Table 1). A PCR product corresponding to a fragment of the Alt a1 gene (164 bp) was amplified from the remaining 110 isolates. These isolates, of which 86 were isolated from potato and 24 from tomato, could be assigned to either *A. solani* or to phylogenetically related-species, i.e. *A. grandis* and *A. protenta*. Further identification was conducted in order to differentiate between *A. solani* and *A. grandis* isolates using PCR/RFLP, by amplifying the calmodulin locus followed by restriction enzyme digestion (*Hae*II and *Rsa*I). Based on the characteristic electrophoretic profiles of the restricted PCR products, *A. solani* and *A. protenta* were separated from *A. grandis*. Thus, of the 110 isolates that gave positive signals with the OasF7/OasR6 primer pair, 93 were *A. solani*, 12 were *A. grandis* and five showed abnormal enzymatic restriction digestion patterns that may be due to partial digestion with at least one of the restriction enzymes. These five isolates, as well as 37 other representative isolates obtained from the two host plants collected in nine of the twelve surveyed Algerian regions and representing the three identified species (*A. linariae*, *A. grandis* and *A. solani*), were selected for species confirmation by DNA sequencing which was firstly performed at the calmodulin locus. Phylogenetic analyses of sequences derived from the calmodulin locus of the 42 isolates (Figure 3) separated the isolates into two clades: the first (A) contained the isolates previously identified by PCR with specific primers as *A. linariae*, and the second (B) included two sub clades (B1 and B2) regrouping isolates previously identified as *A. grandis* (sub clade B1) and *A. solani* (sub clade B2). DNA sequencing at the RPB2 locus then carried out on the isolates of the sub clade B2 gave the phylogenetic tree shown in Figure 4, in which among the 17 isolates of *A. solani*, three were identified as *A. protenta*, two of which were isolated from the potato and one from tomato.

Table 1. Identification of large-spored of *Alternaria* spp isolates.

Isolate	Species ^a	Host	Geographic origin	PCR OATF4/OATR2	PCR OAsF7/OAsR6	PCR RFLP Profile ^b	CAL	Rpb2
DA001	<i>A. linariae</i>	Potato	Tipaza	+	-	ND	MH243795	-
DA002	<i>A. linariae</i>	Potato	Tipaza	+	-	ND	MH243769	-
DA003	<i>A. linariae</i>	Potato	Tipaza	+	-	ND	MH243793	-
DA005	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Alger	-	+	S	-	-
DA006	<i>A. linariae</i>	Potato	Alger	+	-	ND	MH243789	-
DA007	<i>A. linariae</i>	Potato	Alger	+	-	ND	MH243794	-
DA008	<i>A. solani</i>	Potato	Alger	-	+	S	MH243805	MH243818
DA009	<i>A. grandis</i>	Potato	Alger	-	+	?	MH243790	-
DA010	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Alger	-	+	S	-	-
DA011	<i>A. solani</i>	Potato	Alger	-	+	S	MH243806	MH243820
DA012	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Alger	-	+	S	-	-
DA013	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Alger	-	+	S	-	-
DA014	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Alger	-	+	S	MH243796	-
DA015	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA016	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA017	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA018	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA019	<i>A. solani</i>	Potato	Bouira	-	+	S	MH243808	MH243822
DA020	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA021	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA022	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA025	<i>A. solani</i>	Potato	Bouira	-	+	S	MH243786	MH243823
DA026	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA028	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA029	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA030	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA031	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA032	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA033	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA034	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA035	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Mascara	-	+	S	-	-
DA036	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Mascara	-	+	S	-	-
DA037	<i>A. linariae</i>	Tomato	Mostaganem	+	-	ND	-	-
DA038	<i>A. grandis</i>	Potato	Alger	-	+	G	MH243770	-
DA039	<i>A. linariae</i>	Potato	Alger	+	-	ND	-	-
DA040	<i>A. linariae</i>	Tomato	Mascara	+	-	ND	MH243792	-
DA041	<i>A. linariae</i>	Tomato	Mostaganem	+	-	ND	-	-
DA042	<i>A. linariae</i>	Tomato	Mostaganem	+	-	ND	-	-
DA043	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Mostaganem	-	+	S	-	-
DA045	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Mascara	-	+	S	-	-
DA046	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Mostaganem	-	+	S	-	-
DA047	<i>A. grandis</i>	Potato	Mostaganem	-	+	G	MH243771	-
DA048	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Mostaganem	-	+	S	-	-
DA049	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Chlef	-	+	S	-	-
DA050	<i>A. solani</i>	Potato	Chlef	-	+	S	MH243772	MH243809
DA051	<i>A. grandis</i>	Potato	Chlef	-	+	G	-	-
DA052	<i>A. grandis</i>	Potato	Chlef	-	+	G	MH243773	-

(Continued)

Table 1. (Continued).

Isolate	Species ^a	Host	Geographic origin	PCR OATF4/OATR2	PCR OAsF7/OAsR6	PCR RFLP Profile ^b	CAL	Rpb2
DA053	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Chlef	-	+	S	-	-
DA054	<i>A. grandis</i>	Potato	Mostaganem	-	+	G	MH243774	-
DA055	<i>A. grandis</i>	Potato	Mostaganem	-	+	G	-	-
DA056	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Mostaganem	-	+	S	-	-
DA057	<i>A. solani</i>	Potato	Mascara	-	+	?	MH243791	MH243819
DA058	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Mascara	-	+	S	-	-
DA059	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Mostaganem	-	+	S	-	-
DA060	<i>A. grandis</i>	Potato	Mostaganem	-	+	G	MH243775	-
DA061	<i>A. grandis</i>	Potato	Mostaganem	-	+	G	-	-
DA062	<i>A. protenta</i>	Tomato	Mostaganem	-	+	S	MH243797	MH243810
DA063	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA064	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA065	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA066	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA067	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA068	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA069	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA070	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA071	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA072	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA073	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA074	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA075	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA076	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA077	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA078	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA079	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA080	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA081	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA082	<i>A. protenta</i>	Potato	El Oued	-	+	?	KX870505	KX870507
DA083	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA084	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA085	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA086	<i>A. protenta</i>	Potato	El Oued	-	+	S	KX870506	KX870508
DA087	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA088	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA089	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA090	<i>A. solani</i>	Potato	El Oued	-	+	S	MH243776	MH243811
DA091	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA092	<i>A. solani s.l</i>	Potato	El Oued	-	+	S	-	-
DA093	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Alger	-	+	S	-	-
DA094	<i>A. solani</i>	Potato	Alger	-	+	S	MH243798	MH243812
DA096	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Alger	-	+	S	-	-
DA097	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Alger	-	+	S	-	-
DA098	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Alger	-	+	S	-	-
DA099	<i>A. grandis</i>	Tomato	Alger	-	+	G	MH243777	-
DA100	<i>A. linariae</i>	Tomato	Alger	+	-	ND	MH243807	-

(Continued)

Table 1. (Continued).

Isolate	Species ^a	Host	Geographic origin	PCR OATF4/OATR2	PCR OAsF7/OAsR6	PCR RFLP Profile ^b	CAL	Rpb2
DA101	<i>A. linariae</i>	Tomato	Alger	+	-	ND	MH243778	-
DA102	<i>A. linariae</i>	Tomato	Alger	+	-	ND	-	-
DA103	<i>A. linariae</i>	Tomato	Alger	+	-	ND	-	-
DA104	<i>A. linariae</i>	Tomato	Alger	+	-	ND	-	-
DA107	<i>A. linariae</i>	Tomato	Alger	+	-	ND	-	-
DA108	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Guelma	-	+	S	-	-
DA109	<i>A. linariae</i>	Tomato	Tipaza	+	-	ND	MH243779	-
DA110	<i>A. linariae</i>	Tomato	Tipaza	+	-	ND	-	-
DA111	<i>A. linariae</i>	Tomato	Tipaza	+	-	ND	MH243780	-
DA112	<i>A. linariae</i>	Potato	Skikda	+	-	ND	-	-
DA113	<i>A. solani</i>	Tomato	Guelma	-	+	S	MH243799	MH243821
DA114	<i>A. solani</i>	Potato	Guelma	-	+	?	MH243788	MH243813
DA115	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA116	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Bouira	-	+	S	-	-
DA117	<i>A. linariae</i>	Tomato	Biskra	+	-	ND	-	-
DA118	<i>A. linariae</i>	Tomato	Biskra	+	-	ND	-	-
DA119	<i>A. linariae</i>	Tomato	Biskra	+	-	ND	MH243800	-
DA120	<i>A. linariae</i>	Tomato	Biskra	+	-	ND	-	-
DA121	<i>A. linariae</i>	Tomato	Biskra	+	-	ND	-	-
DA122	<i>A. linariae</i>	Tomato	Biskra	+	-	ND	-	-
DA123	<i>A. solani s.l</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	-	-
DA124	<i>A. linariae</i>	Tomato	Biskra	+	-	ND	-	-
DA125	<i>A. linariae</i>	Tomato	Biskra	+	-	ND	-	-
DA126	<i>A. linariae</i>	Tomato	Biskra	+	-	ND	-	-
DA127	<i>A. linariae</i>	Tomato	Biskra	+	-	ND	-	-
DA128	<i>A. solani s.l</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	-	-
DA129	<i>A. solani s.l</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	-	-
DA130	<i>A. solani s.l</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	-	-
DA131	<i>A. solani s.l</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	-	-
DA132	<i>A. solani s.l</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	-	-
DA133	<i>A. solani s.l</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	-	-
DA134	<i>A. linariae</i>	Tomato	Biskra	+	-	ND	-	-
DA135	<i>A. solani s.l</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	-	-
DA136	<i>A. solani</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	MH243801	MH243814
DA137	<i>A. solani s.l</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	-	-
DA138	<i>A. solani s.l</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	-	-
DA139	<i>A. solani s.l</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	-	-
DA140	<i>A. solani</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	MH243802	MH243815
DA141	<i>A. solani</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	MH243803	MH243816
DA142	<i>A. solani</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	MH243804	MH243817
DA143	<i>A. solani s.l</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	-	-
DA144	<i>A. linariae</i>	Tomato	Biskra	+	-	ND	-	-
DA145	<i>A. solani s.l</i>	Tomato	Biskra	-	+	S	-	-
DA146	<i>A. solani s.l</i>	Potato	Tipaza	-	+	S	-	-
DA147	<i>A. linariae</i>	Tomato	Tipaza	+	-	ND	MH243781	-
DA148	<i>A. linariae</i>	Tomato	Mostaganem	+	-	ND	-	-
DA149	<i>A. linariae</i>	Tomato	Mostaganem	+	-	ND	-	-

(Continued)

Table 1. (Continued).

Isolate	Species ^a	Host	Geographic origin	PCR OATF4/OATR2	PCR OAsF7/OAsR6	PCR RFLP Profile ^b	CAL	Rpb2
DA150	<i>A. linariae</i>	Tomato	Mostaganem	+	-	ND	-	-
DA152	<i>A. grandis</i>	Tomato	Alger	-	+	G	MH243782	-
DA153	<i>A. linariae</i>	Tomato	Alger	+	-	ND	MH243783	-
DA154	<i>A. grandis</i>	Tomato	Alger	-	+	?	MH243787	-
DA155	<i>A. grandis</i>	Tomato	Alger	-	+	G	MH243784	-
DA156	<i>A. grandis</i>	Tomato	Alger	-	+	G	MH243785	-

^a Species names in bold characters were supported by sequence data; *A. solani s.l* stands for *A. solani sensu lato* (i.e. including *A. protenta*). ^b PCR-RFLP profiles: S = typical of *S. solani*; G = typical of *A. grandis*; ND = not determined; ? = atypical restriction profile



Figure 3. Phylogenetic tree reconstructed by the maximum likelihood method from the alignment of calmodulin sequences of 42 isolates belonging to the *Alternaria* section *Porri*. Bootstrap support values greater than 80 % are indicated by arrows. The calmodulin sequences of the following strains were included as references: *A. linariae* CBS 109156 (GenBank number JQ646257), *A. protenta* CBS 116696 (GenBank number JQ646236), *A. solani* CBS 109157 (GenBank number KJ397981), *A. grandis* CBS 109158 (GenBank number JQ646249). The calmodulin sequence from *A. alternata* EGS 34016 (Genbank number JQ646208) was used to root the tree.

Distribution and prevalence of the large-spored *Alternaria* species in the bioclimatic regions of Algeria

The surveys carried out through the different Algerian potato and tomato growing regions revealed the

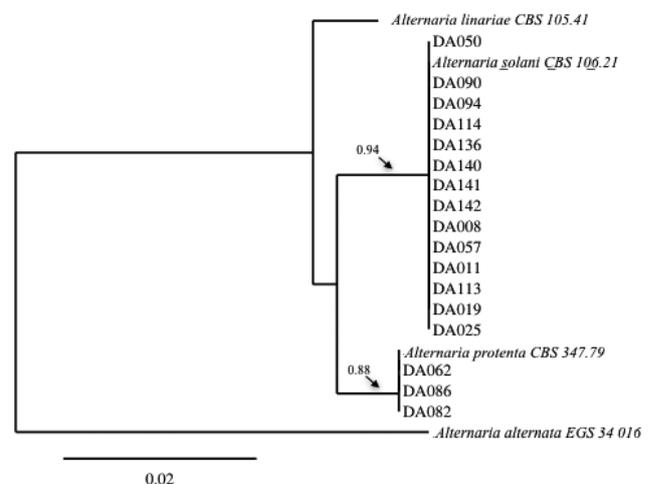


Figure 4. Phylogenetic tree reconstructed by the maximum likelihood method from the alignment of RPB2 sequences of 17 isolates belonging to cluster B2 in the calmodulin phylogeny. Bootstrap support values greater than 80 % are indicated by arrows. The RPB2 sequences of the following strains were included as references: *A. linariae* CBS 105.41 (GenBank number KJ718353), *A. solani* CBS 106.21 (GenBank number KJ718410), *A. protenta* CBS 347.79 (GenBank number KJ718392). The RPB2 sequence from *A. alternata* EGS 34016 (Genbank number JQ646490) was used to root the tree.

presence of *A. grandis*, *A. linariae* and the species complex *A. solani-A. protenta* at variable levels. The frequencies of these species varied according to the host plants (potato or tomato) and to the geographical locations (Table 2). *Alternaria solani sensu lato* (i.e. including *A. protenta*) was the most common species in Algeria, representing 65% of the large-spored isolates, followed by *A. linariae* (25%) and *A. grandis* with low isolation frequency (10%). Isolation frequencies of these species varied with the sampled crop, although they were all found on both potato and tomato. *Alternaria solani sensu lato* (80%) and *A. grandis* (64%) were more prevalent on potato than on tomato. Conversely, *A. linariae*

Table 2. Frequencies of the four large-spored *Alternaria* species according to the host plants (potato and tomato) and to the geographical locations

Origin	<i>A. solani</i> - <i>A. protenta</i>	<i>A. grandis</i>	<i>A. linariae</i>
Host plant origin			
Potato	80.2 ^a –82.8 ^b	64.3–9.6	18.9–7.5
Tomato	19.8–35.2	35.7–9.2	81.1–55.6
Geographic origin (bioclimatic area)			
Mediterranean	16.7–39.0	50.0–17.0	48.6–44.0
Semi-arid	34.3–70.2	50.0–14.9	18.9–14.9
Arid	49.0–79.7	0–0	32.4–20.3

^a Percentage of the total number of isolates of the same species according to the host plant or the geographic origin

^b Percentage of the total number of isolates from the same host or from the same geographic origin

was more frequently isolated from tomato than from potato. Locations of sample collection could be divided into three temperature and precipitation zones (Mediterranean, semi-arid or arid). In Mediterranean and arid zones, isolates were almost equally distributed between potato and tomato. *Alternaria linariae* was over-represented in the Mediterranean zone (44% of the collected isolates) compared to the arid zone where it represented only 20% of the collected isolates. The reverse situation was observed for *A. solani sensu lato*. *Alternaria grandis* was not isolated from samples collected from the arid zone, although it represented 15% of isolates from the semi-arid zone and 17% of those from the Mediterranean zone. Only small-spored *Alternaria* isolates were obtained from samples in two locations, i.e. Ain Defla and Laghouat.

Pathogenicity and parasitic specialization of Alternaria species on potato and tomato

Fourteen isolates representing the four large-spored *Alternaria* species were used in the pathogenicity tests. These were: *A. solani* (isolates DA008, DA114, DA140 and DA141), *A. grandis* (isolates DA009, DA060, DA099 and DA152), *A. protenta* (DA062, DA082 and DA086) and *A. linariae* (DA002, DA007 and DA153). The symptoms (necroses surrounded by yellow halos) obtained on detached leaflets in Petri dish assays were confirmed by high degrees of aggressiveness obtained on whole seedling plants of potato and tomato (Figure 5). All the tested isolates produced symptoms on both plant species irrespective of their host plant of origin (Figure 6). The



Figure 5. Symptoms on detached leaflets (a, d) and whole tomato (c, e) or potato (b, f) plants inoculated by *A. linariae* isolate DA002 (a, b and c) or by *A. grandis* isolate DA009 (d, e and f)

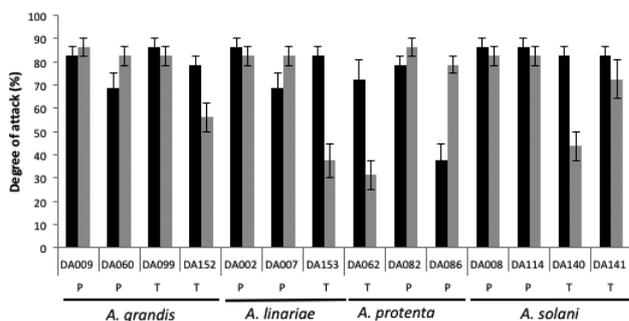


Figure 6. Disease severity evaluated using a visual rating scale (0–100%) at 15 days post-inoculation of tomato (black bars) and potato (grey bars) leaves with isolates representing the four large-spored *Alternaria* species. Letters (P or T) under the isolates identities refer to the host of origin (Potato or Tomato).

degrees of aggressiveness for each host/pathogen combination varied for the isolates, however. On average, *A. solani* isolates were more aggressive on both tomato and potato, while *A. protenta* isolates were less aggressive with a marked preference for their original host plants.

DISCUSSION

Early blight has long been attributed to large-spored *Alternaria* species, i.e. *A. solani* and *A. grandis* on potato and *A. solani* and *A. linariae* on tomato. Small-spored species related to *A. alternata* are considered to be responsible for the brown spot disease (Nolte, 2008, Tymon *et al.*, 2016). The surveys carried out in Alge-

ria between 2012 and 2015 have shown the presence of several *Alternaria* species producing large conidia in samples from both hosts with typical early blight symptoms, as well as in samples with symptoms that resemble brown spot. On the other hand, many Algerian isolates of the section *Alternaria* collected by Bessadat *et al.* (2017) have caused typical early blight symptoms after artificial inoculations on tomato, and were therefore considered pathogenic but with low aggressiveness. This complicated the attribution of a given symptom to a given *Alternaria* species. Moreover, morphological similarities between species within the *Alternaria* section *Porri* precludes reliable identification at the species level based only on these criteria. In the present work, molecular tools were used to confirm the identity of large-spored isolates originating from tomato and potato leaves. The diagnostic species-specific primers developed by Gannibal *et al.* (2014) were successfully used to quickly characterized 147 isolates from a collection the 155 large-spored isolates, and to distinguish *A. linariae* from isolates that could correspond to either *A. solani*, *A. grandis* or *A. protenta*. No amplification signal was obtained for eight isolates either due to poor quality of the extracted DNA or because these isolates corresponded to another species within section *Porri*. Although never previously observed in Algeria, it has recently been reported that *A. macrospora* may be responsible for leaf spot of tomato in China (Zhang *et al.*, 2017). To discriminate between *A. grandis*, on one hand, and *A. solani* or *A. protenta*, on the other, we took advantage of sequence polymorphism within the calmodulin gene to develop a PCR-RFLP assay. Reliability of these diagnostic methods was checked by sequencing the calmodulin locus, and taken together they allowed us to accurately type more than 90% of the large-spored isolates without the need for nucleotide sequencing. Applying these tools to our isolates, we observed that *A. solani* and *A. linariae* predominate on their respective potato or tomato hosts in most of the surveyed areas. In agreement with recent observations (Bessadat *et al.*, 2017, Ayad *et al.*, 2018), the presence of *A. linariae* and *A. grandis* in Algeria, traditionally considered to be restricted, respectively, to either tomato or potato, was also confirmed on these two plant hosts. *Alternaria linariae* was found on potato and *A. grandis* on tomato in the coastal regions of Algiers and Tipaza, where these two crops often exist side by side or follow each other in the same plot during the seasons. *Alternaria grandis* has not been isolated from the Saharan regions that are characterized by warm and arid periods during each year. Analyses of nucleotidic polymorphism at the RPB2 locus has shown that *A. protenta* was recorded for the first time on tomato in the coastal

region of Mostaganem (northwest of Algeria), where the climate is very different from that of the South. This species has already been reported on potato in Belgium (Landschoot *et al.*, 2017), but also in a particular region of the south of Algeria (El Oued), where the temperatures are high and the potato crops are grown under overhead irrigation (Ayad *et al.*, 2017).

Cross inoculations carried out with isolates representing the four identified large-spored *Alternaria* species (*A. solani*, *A. grandis*, *A. linariae* and *A. protenta*) on potato and tomato, showed that aggressiveness toward the two host plants varied according to the isolates but not with respect to particular fungal species. Similar experiments carried out on detached leaves with *A. linariae* and *A. grandis* (Rodrigues *et al.*, 2010; Cardoso, 2014; Gannibal *et al.*, 2014) have previously shown that these two species were able to cause disease on both plants with more severe symptoms on their respective traditional hosts. This suggests that the parasitic specialization of large-spored *Alternaria* species on solanaceous crops should be reconsidered.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the UMR 1345 IRHS, Université d'Angers-INRA-Agrocampus Ouest (France) for hosting D. Ayad, and the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria for awarding her scholarship.

LITERATURE CITED

- Ayad D., Leclerc S., Hamon B., Kedad A., Bouznad Z., Simoneau P., 2017. First report of early blight caused by *Alternaria protenta* on potato in Algeria. *Plant Disease* 101: 836.
- Ayad, D., Hamon B., Kedad A., Bouznad Z., Simoneau P., 2018. First report of early blight caused by *Alternaria linariae* on potato in Algeria. *Plant Disease* 102: 2651.
- Bessadat, N., Hamon B., Henni J.E., Simoneau P., 2016. First report of tomato early blight caused by *Alternaria grandis* in Algeria. *Plant Disease* 100: 533.
- Bessadat N., Berruyer R., Hamon B., Bataille-Simoneau N., Benichou S., ... Simoneau P., 2017. *Alternaria* species associated with early blight epidemics on tomato and other *Solanaceae* crops in northwestern Algeria. *European Journal of Plant Pathology* 148: 181–197.
- Cardoso, C.R., 2014. *Potato and tomato early blight: molecular identification of Alternaria species, Host range and epidemics*. PhD Thesis, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 90 pp.

- CIP (International Potato Center), 2008. *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* on potato and outdoor production of tomato. *Bulletin OEPP/EPPO* 38: 319–321.
- Dereeper, A., Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., ... Gascuel O., 2008. Phylogeny. Fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* 1: 36.
- Droby, S., Dinooor A., Prusky D., Barkaigolan R., 1984. Pathogenicity of *Alternaria alternata* on potato in Israel. *Phytopathology* 74: 537-542.
- Gannibal, P.B., Orina A.S., Mironenko N.V., Levitin M.M., 2014. Differentiation of the closely related species, *Alternaria solani* and *A. tomatophila*, by molecular and morphological features and aggressiveness. *European Journal of Plant Pathology* 139: 609–623.
- Galloway, B.T., 1891. The new potato disease. *Garden and Field*, Adelaide, Australia 16, 158.
- Goodwin, D.C., Lee S.B., 1993. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques* 15: 438–444.
- Jones, L.R., 1893. The new potato disease or early blight. *Vermont Agricultural Experimental Station Bulletin* 6: 66–70.
- Jones, L.R., Grout A.J., 1897. Notes on two species of *Alternaria*. *Bulletin of the Torrey Botanical Society* 24: 254–258.
- Landschoot, S., Vandecasteele M., De Baets B., Höfte M., Audenaert K., Haesaert G., 2017. Identification of *A. arborescens*, *A. grandis*, and *A. protenta* as new members of the European *Alternaria* population on potato. *Fungal Biology* 121: 172-188.
- Lawrence, D.P., Gannibal P.B, Peever T.L., Pryor B.M., 2013. The sections of *Alternaria*: Formalizing species-groups concepts. *Mycologia*, 105: 530–546.
- Liu, Y.J., Whelen S., Hall B.D., 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1799 -1808.
- Lourenço, V. Jr., Moya A., González-Candelas F., Carbone I., Maffia L.A., Mizubuti E.S.G., 2009. Molecular diversity and evolutionary processes of *Alternaria solani* in Brazil inferred using genealogical and coalescent approaches. *Phytopathology* 99: 765–774.
- Nolte, P., 2008. Brown Spot and Black Pit of Potato: The Other Early Blight. *American Vegetable Grower* 56: 32–33.
- Odilbekov, F., 2015. *Resistance to Early Blight in Potato and Genetic Structure of the Pathogen Population in Southeast Sweden*. PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Science, 46 pp.
- Rodrigues, T.T.M.S., Berbee M.L., Simmons E.G., Cardoso C.R., Reis A., Maffia L.A., 2010. First report of *Alternaria tomatophila* and *A. grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. *New Disease Reports* 22: 28.
- Simmons E.G., 2000. *Alternaria* themes and variations (244-286) species on *Solanaceae*. *Mycotaxon* 75: 1-115.
- Simmons, E.G., 2007. *Alternaria*: an identification manual. CBS Biodiversity Series 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Netherlands, 775 pp.
- Sung, G.H., Sung J.M., Hywel-Jones N.L., Spatafora J.W., 2007. A multi-gene phylogeny of Cavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 1204- 1223.
- Tymon L.S., Peeverand T.L., Johnson D.A., 2016. Identification and enumeration of small-spored *Alternaria* species associated with potato in the U.S. Northwest. *Plant Disease* 100: 465-472.
- Van der Waals, J.E., Korsten L., Aveling T.A.S., 2001. A review of early blight of potato. *African Plant Protection* 70: 91-102.
- Van der Waals, J.E., Korsten L., Slippers B., 2004. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Disease* 88: 959-964.
- Woudenberg, J.H.C., Truter M., Groenewald J.Z., Crous P.W., 2014. Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled. *Studies in Mycology* 79: 1–47.
- Zhang, M., Li P.H., Gen Y.H., Guo Y.X., Wu H.Y., 2017. First report of *Alternaria macrospora* causing leaf spot of *Solanum lycopersicum* in China. *Plant Disease* 101: 1545.

New data on early blight of potato and tomato caused by a complex of large-spored *Alternaria* species in Algeria

AYAD D.^{1,2}; ARIBI D.¹; HAMON B.²; KEDAD A.¹, SIMONEAU P.² & BOUZNAD Z.¹

¹ENSA-Laboratoire de Phytopathologie et Biologie Moléculaire. Alger, Algeria ; ²UMR 1345 IRHS, Université d'Angers-INRA-Agrocampus Ouest, SFR QUASAV, 42 Rue G. Morel, F-49071 Beaucouzé, France.

SUMMARY

Potato and tomato occupy an important place in the Algerian agriculture. These two speculations remains highly threatened by abiotic and biotic stresses. The surveys carried out in different areas of production since 2010 show that after the downy mildew, early blight was very damaging particularly in areas where the climatic conditions were favourable to the development of the pathogen. From 2012 to 2015, a total of 247 isolates having morphological and cultural characteristics of *Alternaria* were obtained from 12 major growing regions of potato and tomato located in the center, east, west and south of Algeria. On the basis of the morphological characteristics of the isolates (large conidia not catenulated with long beak), 156 isolates belonging to the *A. porri* group were selected for further identification and characterization. Molecular studies based on a PCR using specific primers detected two main species *A. solani* and *A. linariae* whose isolates were obtained from samples showing the symptoms of early blight. Sequential analysis of the Calmodulin gene confirmed the existence of *A. linariae* in the potato and tomato samples. In addition, these analyzes detected among the isolates of *A. solani*, isolates belonging rather to the species *A. grandis* whose samples are also from potato and tomato. Finally, the sequential analyses of the Rpb2 gene have revealed the existence of three isolates belonging to the species *A. protenta* among the isolates initially identified as *A. solani*. Pathogenicity tests carried out by artificial inoculation showed that all isolates belonging to the four species : *A. solani*, *A. linariae*, *A. grandis* and *A. protenta* isolated from potato and tomato field cause the typical early blight symptoms on detached leaflets and whole seedlings of the two host with varying levels of attack. These results confirm the ability of *A. grandis* to also attack tomatoes while it is traditionally found on potato. We show especially for the first time the presence of *A. linariae* on potato culture while this species was always described on tomato. These new data oblige us to reconsider the parasitic specialization of *Alternaria* species with large conidia on solanaceae particularly on potato and tomato.

KEYWORDS:

Early blight, potato, tomato, prevalence, large-spored *Alternaria* spp, parasitic specialization,

INTRODUCTION

Potato (*Solanum tuberosum* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.) are the most important and useful member of the family solanaceae. They represent the first vegetable crop in terms of acreage and production in Algeria (Chehat, 2008). In 2013, Algeria occupied the second rank after Egypt in the production of potatoes in Africa. The national potato production in the last decade (2003-2013) has increased from 1 879 918 to 4 400 000 tonnes for an increase in the acreage under cultivation from 88 660 to 140 000 hectares. Similarly during the same periode the yield has increased significantly from 212 to 314,3 Qx/ha (FAOSTAT, 2015). These two crops are distributed differently in some areas, and are conducted according to different cultural practices. The potato which is considered as field crop occupies significant acreage in several regions of the country from north to south and from east to west. On the contrary, tomato is cultivated in the north part of Algeria on smaller surface areas and most often under plastic house as in the Biskra region. Both crops can exist side by side and can follow each other in many coastal regions of the country.

Among the fungal diseases infecting potato and tomato crops, early blight which is a widely distributed disease can cause significant economic yield losses (Pscheidt and Stevenson 1986; Rotem 1994). Early blight epidemics are particularly severe in tropical countries during warm and wet seasons (Batista et al.2006; Mantecon, 2007). Nevertheless, the disease is becoming more severe in all regions partly due to warmer temperatures (Kapsa, 2008). The early blight symptoms of tomato and potato most frequently observed take two forms : more or less large spots often with yellowing around them and many more spots often quite small. These symptoms have been attributed to several *Alternaria* species : *A. alternata* when the conidia are small and catenulate, *A. solani* on potato and *A. linariae* (= *A. tomatophila*) on tomato when the conidia are large and solitary. With the molecular markers, several species morphologically identical with small conidia like *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuis* have been reported on both host plants (Simmons, 2000). Likewise, several species morphologically similar with large conidia have been also reported on potato (*A. solani*, *A. grandis* and *A. protenta*) (Simmons, 2000 ; Orina et al., 2009 ; Gannibal et al., 2014 ; Landschoot et al., 2016) and on tomato (*A. linariae*, *A. solani* and *A. grandis*) (Simmons, 2000 ; Rodrigues et al., 2010). In Algeria, a complex of three species *A. solani*, *A. linariae* and *A.*

alternata were reported to be the causal agents of the potato and tomato early blight (Ayad, 2014 ; Bessadat, 2014, 2016). In two recent publications, it was reported for the first time in Algeria the presence of *A. protenta* on potato (Ayad et al. 2016) and *A. grandis* on tomato (Bessadat, 2016). This indicates the complexity and the difficulty to assign a given species to a symptom and/or to the morphological characteristics of the conidia.

The objectives of the present study were to identify large-spored pathogenic *Alternaria* species on the basis of molecular, cultural and morphological characteristics and to clarify their pathogenicity on their respective potato and tomato hosts. The cultural, morphological and molecular characterization were based on 156 isolates collected during 04 years (2012-2015) on various potato and tomato fields in different bioclimatic zones of Algeria. To better highlight the different species present in Algeria, the sequences of different genomic regions such as ITS region, Calmodulin and RPB2 genes were analyzed. In addition, the parasitic specialization of *A. linariae* and *A. protenta* newly identified on potato were verified by artificial cross inoculations under conditions very similar to those in the field

MATERIALS AND METHODS

PROSPECTION, SAMPLING AND ISOLATION

Surveys were carried out in the period 2012 to 2015 and sampling was performed in 12 potato and tomato-growing regions from north (10, 16, 42) to south (03, 07, 39) and from east (21,24) to west (02, 27, 29, 44) of Algeria (Fig.1). More than 247 samples with typical early blight symptoms (dark, elongated or circular lesions with concentric rings surrounded by a yellow halo) were collected for isolation. Lesions with typical early blight symptoms were cut off from infected leaflets, disinfected and placed on potato dextrose agar medium at 22°C. The isolates obtained were purified by monospore culture on potato dextrose agar medium. The occurrence and the prevalence of the disease were evaluated by the percentage frequencies of the *Alternaria* species responsible of the early blight in these two potato and tomato crops and in the different growing regions.

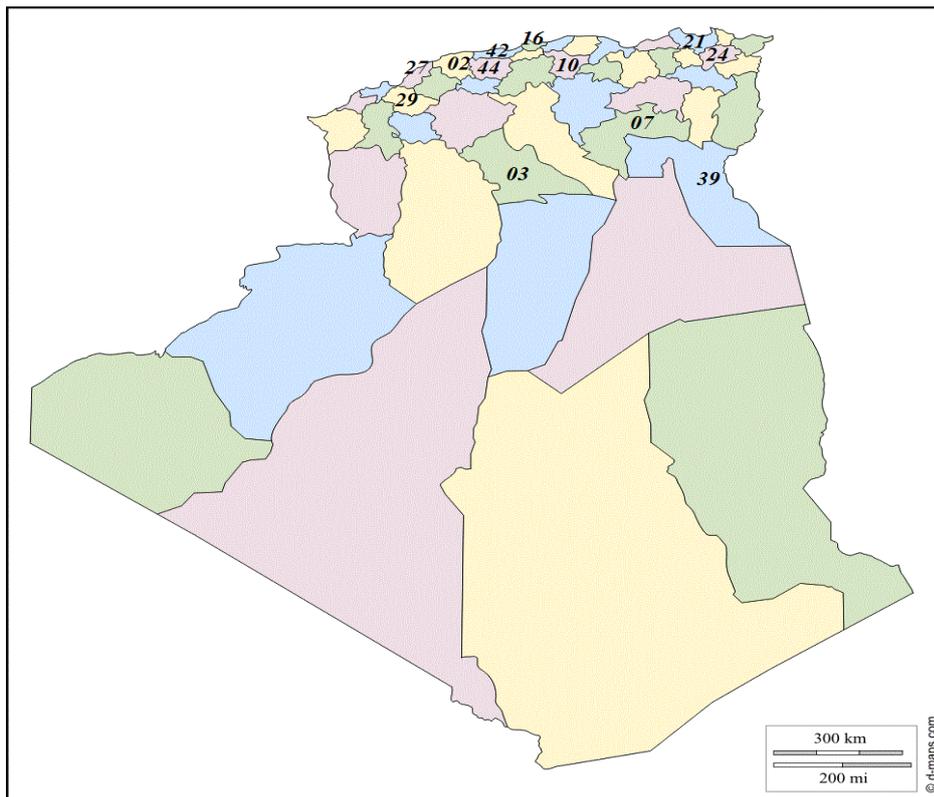


Figure 1. Geographical localization of the potato and tomato- regions prospecteds

IDENTIFICATION OF LARGE-SPORED ALTERNARIA SPECIES USING MOLECULAR MARKERS

This study was carried out on the 156 isolates previously selected. Total genomic DNA was extracted according to the method described by Goodwin et Lee (1993). PCR using specific primers of *A.solani*/*A.grandis* group and *A. linariae* was

performed. The primer pairs ITS1/ITS4 that gives good amplifications on the *Alternaria* species were used (White et al., 1990 ; Garde et al., 1991). All the DNA extracts of the 156 isolates were amplified. Two primer pairs OAsF7 et OAsR6 specific to both species *A. solani* et *A. grandis* for the amplification of the 164 bp of the gene encoding Alt a1 and OatF4 et OatR2 which are specific to *A. linariae* for the amplification of the 438 pb of the gene encoding for the Calmodulin were used (Gannibal et al., 2013). These preliminary identifications were completed by PCR/RFLP using restriction enzymes *HaeII* and *RsaI* to differentiate between the two species *A. solani* and *A. grandis*. Of the 156 isolates identified by PCR and PCR/RFLP, 25 isolates were selected and their DNA was amplified at the Calmodulin loci. The PCR products were sent to GATC Biotech (Germany) for sequencing. To confirm the presence of *A. protenta* among the *A. solani* isolates, the locus Rpb2 of all *A. solani* isolates was amplified. All the sequences of the 25 isolates obtained after sequencing were analysed by the BLAST tool and compared with those in the NCBI databases. Sequence alignment was carried out with the software phylogeny.fr ("One Click").

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF LARGE-SPORED *ALTERNARIA* SPECIES

Of the 25 isolates previously identified by molecular tools, 15 isolates were morphologically characterized. The morphological characteristics used for the identification of the 15 isolates were based on the following criteria : hyphal width, body conidia length and width, beak length, number of horizontal and vertical septa. The measurements of the conidia were compared with those in the literature (Simmons 2007).

PATHOGENICITY OF LARGE-SPORED SPECIES ON THEIR RESPECTIVE POTATO AND TOMATO HOSTS

To confirm the pathogenicity of the larges spored *Alternaria* species, inoculations on detached leaflets and on whole plants were performed on susceptible varieties of tomato (Marmande and St Pierre) and potato (Spunta and Sarpomira). A collection of 7 *A. solani*, 3 *A. linariae*, 3 *A. grandis* and 2 *A. protenta* isolates was used. These isolates were selected for their ability to sporulate. Spore suspensions have been prepared from 15 days old cultures whose sporulation was checked with Malassez hemocytometer. The final concentrations of the suspensions were adjusted to 10⁴ conidia/ml. The inoculations were made by depositing drops of 20 µl on detached leaflets and by spraying the whole plants. The disease severity was evaluated by using a visual rating scale from 1 to 9 expressing the extension of necrosis according to Duarte et al. (2013). Statistical analyzes of the results were made with Statistica 6.0 software which enable analysis of variance.

RESULTS AND DISCUSSION

PRÉ-IDENTIFICATION OF LARGE-SPORED *ALTERNARIA* SPECIES

The 247 isolates obtained were divided in two groups on the basis of the morphological characteristics : the first group (91 isolates) with abundant sporulation and small catenulate conidia typical of the section *Alternata*, the second group (156 isolates) with large, solitary, beaked conidia typical of the section *Porri*. These isolates were selected under a binocular stereomicroscope and microscope and compared with those in the literature (Simmons, 2007). The small-spored group have not been included in our study.

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF LARGE-SPORED *ALTERNARIA* SPECIES

The preliminary tests carried out for the identification of the 156 isolates selected on the basis of morphological characters (large conidia with long beak) and analyzed by the universal primers specific for both groups of *Alternaria* species (*Alternaria solani* *A. grandis* OAsF7/R6 and *A. linariae* OATF4/R2) have confirmed the presence of these three species on potato crop in Algeria. These species were already reported in Algeria by Bessadat (2016) and around the world by Gannibal et al. (2012), Rodriguez et al. (2009), Landschoot et al. (2017). Further species identification was conducted in order to differentiate between *A. solani* and *A. grandis* isolates on the one hand, and to confirm the identification of *A. linariae* on the other. PCR/RFLP by amplifying the locus Calmodulin followed by restriction enzyme digestion (*HaeII* and *RsaI*) of the PCR products has resulted in the identification of 43 *A. linariae* isolates, 92 *A. solani* isolates, 12 *A. grandis* isolates and 6 isolates which showed an anormal restriction enzyme digestion. The sequencing of 22 isolates representing each of the three species identified previously and isolated from the two host plants collected in the 12 surveyed regions gave the phylogenetic tree shown in figure 2. The first cluster contains the *A. linariae* isolates that are distinct from the other two clusters regrouping isolates previously identified as *A. solani*, the second cluster includes *A. solani* isolates, and the third cluster regroups the *A. grandis* isolates. Finally, the sequencing of the Rpb2 locus carried out on the second cluster which include *A. solani* isolates has identified 3 isolates as *A. protenta* two of which were isolated from potato and one was isolated from tomato (Fig.3).

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF LARGE-SPORED *ALTERNARIA* SPECIES

measurements of the hyphal width, the body conidia length and width, the beak length and the number of horizontal and

vertical septa of the four species (*A. solani*, *A. grandis*, *A. linariae* and *A. protenta*) previously identified by molecular tools are indicated in Table 1.

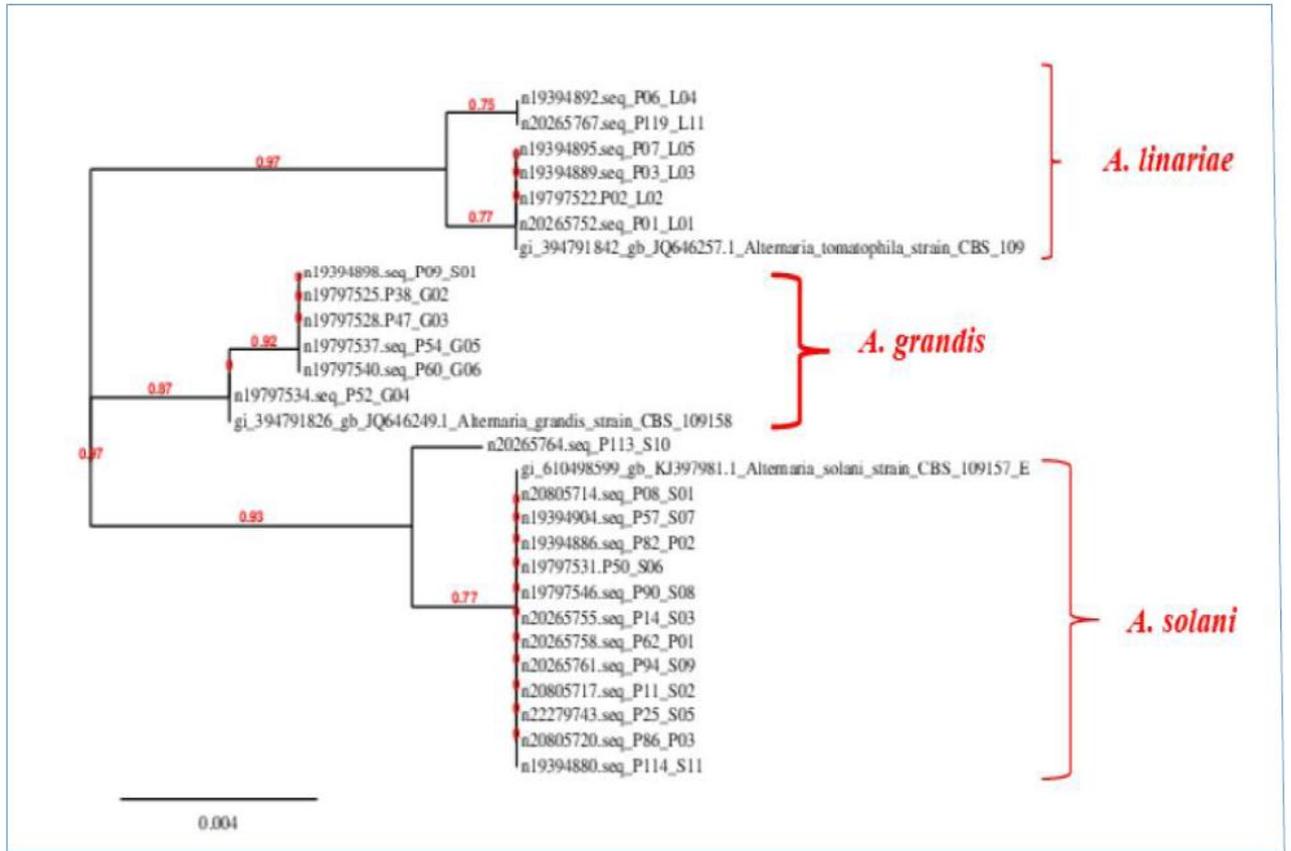


Figure 2. Cluster analysis of sequence at the Calmodulin loci

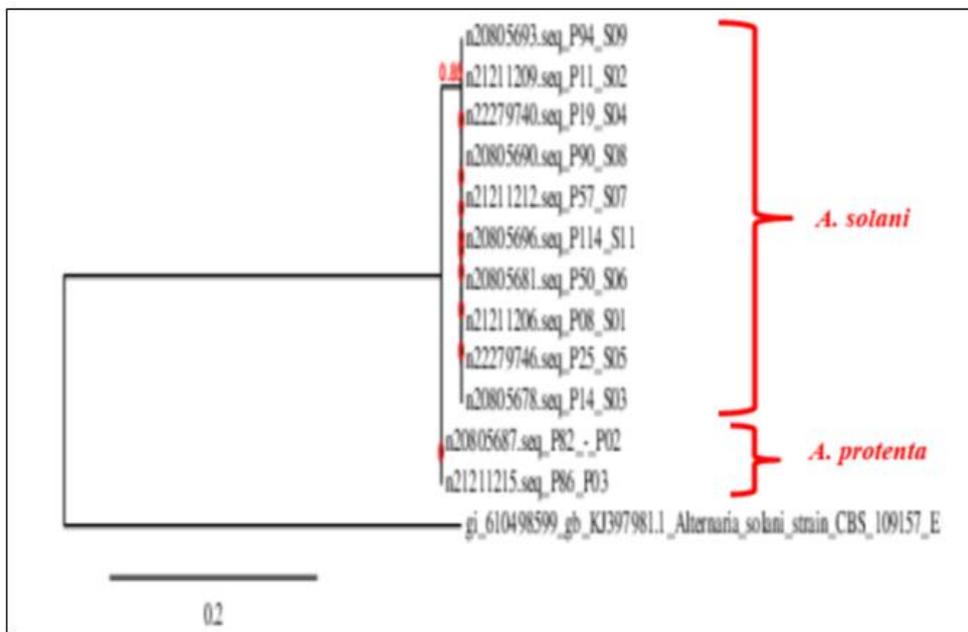


Figure 3. Cluster analysis of sequence at the Rpb2 loci

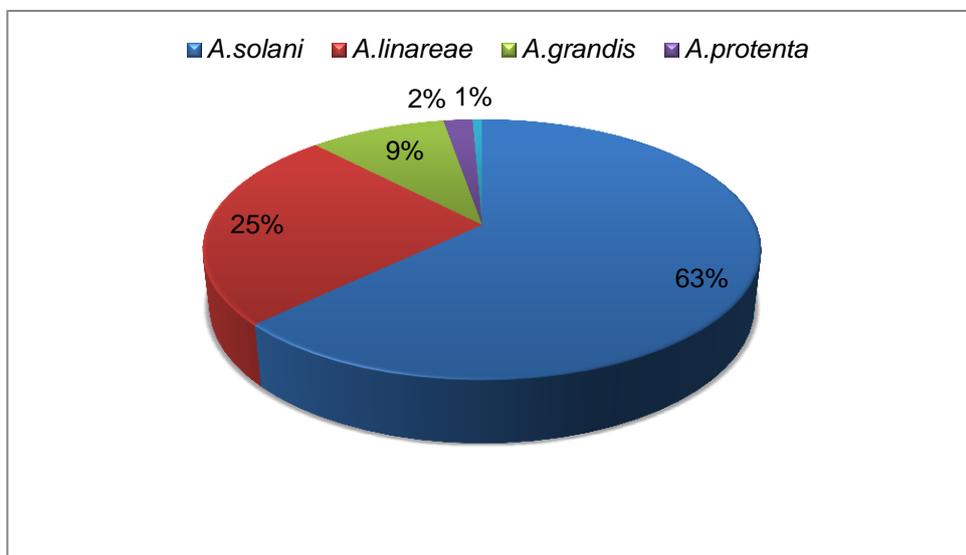
Table 1. Morphological characteristics of 15 isolates identified as *A. solani*, *A. grandis*, *A. protenta* and *A. linariae*

Morphological characteristics	Species			
	<i>A. solani</i>	<i>A. grandis</i>	<i>A. linariae</i>	<i>A. protenta</i>
Hyphal width	4.23–7.57µm	4.40–8.74µm	3.39–8.37µm	3.40–6.67µm
Body conidia length	46.23–80.86µm	36.17–97.15µm	41.08–108.27µm	28.14–93.90µm
Body conidia width	13.47–25.54µm	10.66–21.70 µm	8.47–18.12µm	10.30–22.73µm
Beak length	30.86–114.40µm	61.28–186.57 µm	56.84–224.78µm	34.24–130.4µm
Number of horizontal septa	1–9	1–7	0–3	0–8
Number of vertical septa	1–12	2–11	1–19	1–10

The morphological characteristics of 15 isolates with large conidia shows high variability between them. In addition, there is an overlapping in the characters of the isolates in the shape and the size of the conidia. The morphological characteristics of the isolates did not clearly differentiate between the four large-spored *Alternaria* species currently reported on potato and tomato crops. Therefore, morphological characters are not sufficient for clear distinction between the four large spored *Alternaria* species. Even for some species like *A. solani*, *A. grandis* and *A. protenta*, the molecular characterization is not sufficient for their distinction; only nucleotide polymorphism at selected loci (Rpb2) allows specific identification between the isolates of the two species *A. grandis* and *A. protenta*. ;k

OCCURRENCE AND PREVALENCE OF THE LARGE-SPORED *ALTERNARIA* SPECIES IN ALGERIA

The survey carried out through the 12 growing regions of potato and tomato showed the presence of 4 large-spored *Alternaria* species in Algeria, i.e., *A. solani*, *A. grandis*, *A. linariae* and *A. protenta* at variable levels (Fig. 4). *A. solani* is the most common species in Algeria with 63%. This species has a significant isolation frequency in the south (30.40%) and a relatively small frequency in the east (14.86%) and in the center and the ouest (8.78%) (Fig. 5). The isolation frequencies of the four species identified in Algeria varie also with the crop. *A. solani* attacks both crops potato and tomato, but it is more prevalent on pototo (50.60%) than on tomato (12.15%). These results are consistent with those obtained by Bessadat, (2014) which estimate the incidence of the early blight to 79.63%.

**Figure 4.** Distribution of *Alternaria* spp. in Algeria on potato and tomato

A. solani was considered for long time as the main species responsible for the potato and tomato early blight, however other species such as *A. grandis* et *A. linariae* have been recently reported respectively on potato and tomato (Simons, 2000 ; Rodrigues, 2009). *A. linariae* was isolated from potato for the first time in Algeria with an isolation frequency of 25% (Communication orale, 2016), whereas *A. grandis* was found on tomato (Bessadat et al., 2016). The isolation frequencies of *A. linariae* were 11.48% in the center, 8.10%, in the south, 4.72% in the ouest and 0.67% in the east, in addition this

species is more prevalent on tomato (20.29%) than on potato (4.71%). *A. grandis* has a distribution percentage of 9% and an isolation frequency of 4.72% in the center and the west of Algeria. This species was found on potato (6.08%) and on tomato (3.37%) (Fig. 6). Another species *A. protenta* was characterized through sequencing the Rpb2 gene. Two isolates from potato and on isolate from tomato were identified as *A. protenta* (Ayad, 2016). These results were confirmed by artificial cross inoculations in order to check the pathogenicity of the isolates.

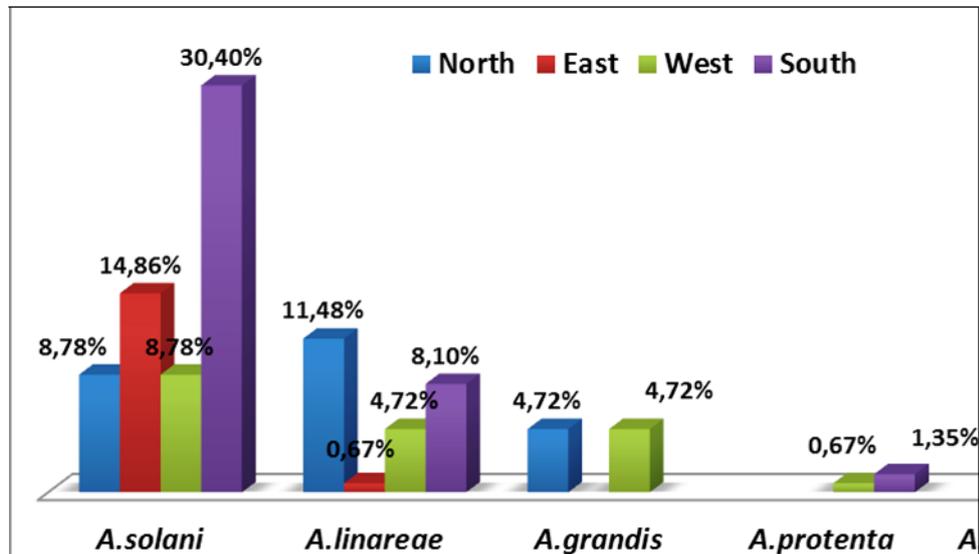


Figure 5. Distribution of *Alternaria* spp. in Algeria according to the potato and tomato growing areas

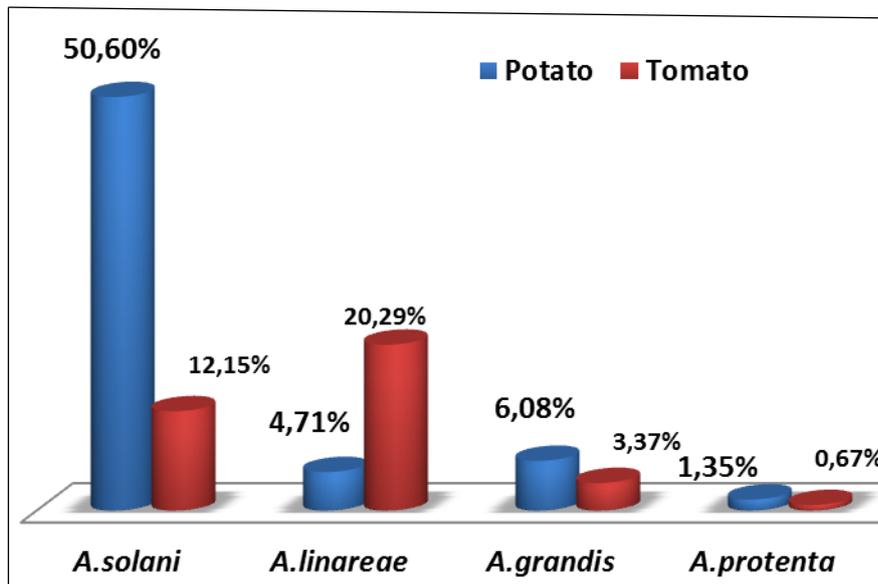


Figure 6. Distribution of *Alternaria* spp. in Algeria according to the potato and tomato crops

We therefore confirm the presence of other *Alternaria* species on potato other than *A. solani* particularly *A. grandis* and *A. protenta* which have been reported by other authors such as *A. grandis* in Europe (Landschoot et al., 2017), South America (Rodrigues et al., 2010), and Algeria (Bessadat et al., 2016). In contrast, we report for the first time in Algeria the presence in the field of *A. linariae* on potato and possibly in the world, and *A. protenta* on potato and tomato.

AGGRESSIVENESS AND PARASITIC SPECIALIZATION OF *ALTERNARIA* SPECIES ON THEIR HOSTS

The high degrees of aggressiveness obtained on whole seedling plants of potato and tomato, shows that the three *Alternaria* spp. (*A. solani*, *A. grandis* and *A. linariae*) isolated from potato or tomato are aggressive on both host plants (Figs. 7 and 8).

These behaviors are also in agreement with those realized *in vitro* conditions by Gilbert and Webbs (2007), and Rodrigues (2009) for *A. linariae* and *A. grandis* respectively on tomato and potato. The same results were also reported by Rodrigues et al. (2010), Gannibal et al. (2014) and Woudenberg (2014) for *A. solani* on potato and tomato. We confirmed that *A. grandis* is formerly considered as responsible of early blight of potato and also tomato in Algeria as showed by Bessadat (2016). In this study we showed that *A. linariae* is pathogenic on potato in field conditions. These results allow us to confirm the absence of parasitic specialisation in the three pathogens with respect to their two hosts: potato and tomato.

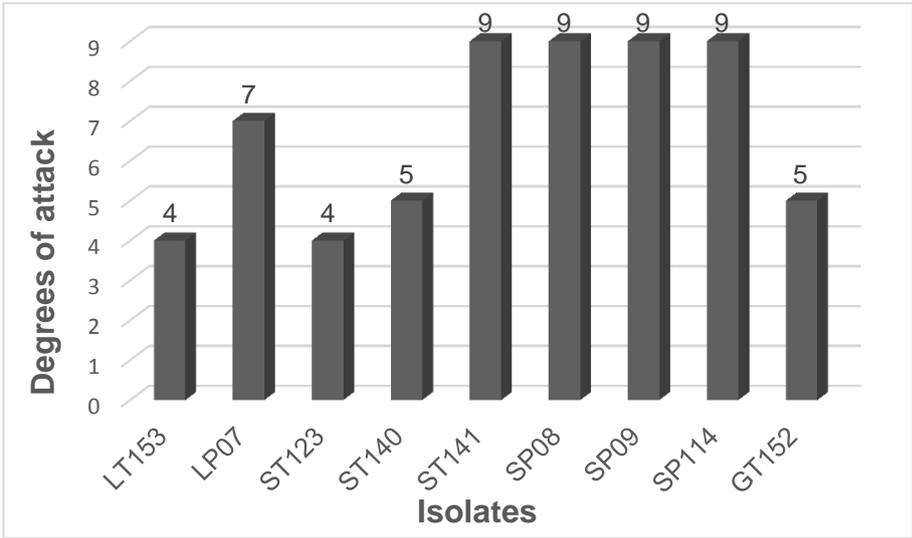


Figure 7 . Degrees of attack of *Alternaria* spp. isolates on potato (S: *A. solani*; L: *A. linariae*; G: *A. grandis*; P: potato; T: tomato)

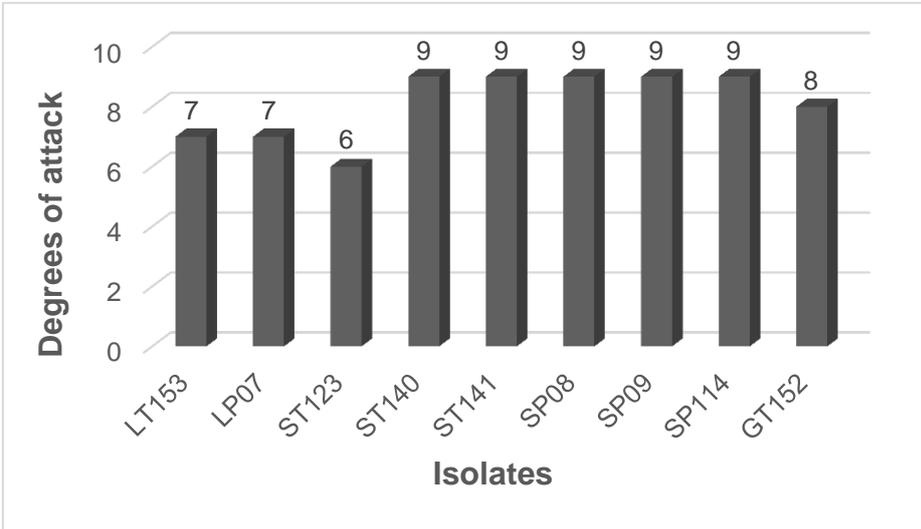


Figure 8. Degrees of attack of *Alternaria* spp. isolates on tomato (S: *A. solani*; L: *A. linariae*; G: *A. grandis*; P: potato; T: tomato)



Figure 09. Symptoms on detached leaflets and whole plants inoculated by par P02 isolate (= *A. linariae* isolated from potato)



Figure 10. Symptoms on detached leaflets and whole plants inoculated by par P09 isolate (= *A. grandis* isolated from potato)

CONCLUSION

The *Alternaria* large-spored species associated with potato and tomato early blight in Algeria were inventoried. *A. solani*, *A. linariae* and *A. grandis* are the common species found on potato and tomato. *A. protenta* was reported on potato and tomato for the first time in Algeria and possibly in the world. Morphological characterization remains insufficient for the distinction of *A. solani*, *A. linariae*, *A. grandis* and *A. protenta*. The identification of these four *Alternaria* species has to be confirmed by molecular markers. Beside *Alternaria alternata* species group, *A. solani* is the most common large spored species on potato; however others species with large conidia such as *A. linariae*, *A. grandis* and *A. protenta* can also infect potato in field conditions in Algeria. *A. solani* and *A. linariae* are the most common species on potato and tomato respectively in all potato and tomato growing regions of Algeria. *A. protenta* and *A. linariae* were found on potato for the first time in Algeria and have been pathogenic on this crop. Our results indicate that *A. linariae* is not specific to tomato as previously reported in the literature since it has been isolated under field conditions from potato for the first time in Algeria and possibly in the world. Also *A. grandis* is not specific to potato.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wants to thank the UMR 1345 IRHS, Université d'Angers-INRA-Agrocampus Ouest (France) with the reception of D. Ayad and the Ministry of higher education and scientific research of Algeria for allowing for awarding her scholarship.

REFERENCES

- Ayad D., A. Mansouri, Y. Moulay, A. Kedad and Z. Bouznad, 2014. Early blight of potato and tomato in Algeria: Importance of disease and phenotypic diversity of pathogenic species. *Phytopathologia Mediterranea* (2015) 54, 1, 140–196
- Ayad, D., S. Leclerc, B. Hamon, A. Kedad, Z. Bouznad and P. Simoneau, 2017. First report of early blight cause by *Alternaria protenta* on potato in Algeria. *Plant Dis.*101 (5): 836
- Batista DC, M.A. Lima, F. Haddad, L.A. Maffia, E.S.G. Mizubuti, 2006. Validation of decision support systems for tomato early blight and potato late blight, under Brazilian conditions. *Crop Prot* 25:664–670.
- Bessadat N., R. Berruyer, B. Hamon, N. Bataille-Simoneau, S. Benichou, M. Kihal, D. E. Henni and P. Simoneau, 2016. *Alternaria* species associated with early blight epidemics on tomato and other *Solanaceae* crops in northwestern Algeria. *Eur. J. Plant Pathol.*
- Bessadat, N., B.Hamon, J. E. Henni and P. Simoneau, 2016. First report of tomato early blight caused by *Alternaria grandis* in Algeria. *Plant Disease*, 100, 533.
- Chehat, 2008. La filière pomme de terre Algérienne : une situation précaire. *Journée d'étude sur la filière pomme de terre : Situation actuelle et perspectives*. I.N.A. El Harrach, le 18 Juin 2008, Alger : 1-11 pp.
- Duarte H.S.S., L. Zambolim, A.S. Capucho, Junior A.F Nogueira, A.W.C. Rosado, C.R. Cardoso, P.A. Paul, E.S.G. Mizubuti, 2013. Development and validation of a set of standard area diagrams to estimate severity of potato early blight. *Eur. J. Plant Pathol.*, 137: 249-257.
- FAOSTAT, 2015. FAO Statistical Pocket. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Gannibal, P. B., A. S. Orina, N. V. Mironenko and M. M. Levitin, 2014. Differentiation of the closely related species, *Alternaria solani* and *A. tomatophila*, by molecular and morphological features and aggressiveness. *Eur J Plant Pathol.*, 139, 609–623.
- Gardes, M. and T. D. Bruns, 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of Mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113–118.
- Goodwin, D. C. and S. B. Lee, 1993. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *BioTechniques*, 15, 438–444.
- Kapsa J.S., 2008. Important threats in potato production and pathogen/ pest management. *Potato Res* 51:385–401.
- Landschoot, S., M. Vandecasteele, B. De Baets, M. Höfte, K. Audenaert and G. Haesaert, 2017. Identification of *A. arborescens*, *A. grandis*, and *A. protenta* as new members of the European *Alternaria* population on potato. *Fungal Biol.*121(2) :172-188..
- Lourenço V. Jr., A. Moya, F. González-Candelas, I. Carbone, L. A., Maffia and E. S. G. Mizubuti, 2009. Molecular diversity and evolutionary processes of *Alternaria solani* in Brazil inferred using genealogical and coalescent approaches. *Phytopathology*, 99, 765–774.
- Lourenço V. Jr., T.T. M. S. Rodrigues, A. M. D. Campos, C. A. D. Braganc, K.K. Scheuermann, A. Reis, S.H. Brommonschenkel, L. A. Maffia and E. S. G. Mizubuti, 2011. Genetic Structure of the Population of *Alternaria solani* in Brazil. *J Phytopathol.* 159: 233–240
- Mantecón, J. D., 2007. Potato yield increases due to fungicide treatment in Argentinian early blight (*Alternaria solani*) and late blight (*Phytophthora infestans*) field trials during the 1996-2005 seasons. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2007-0202-01-RS.
- Orina A.S., P.B. Gannibal and M.M. Levitin, 2012. *Alternaria* species on potatoes on Russia. Presentation Euroblight Workshop St. Petersburg. http://130.226.173.223/euroblight/Workshop/2011_StPetersburg.
- Pscheidt J W and W. R. Stevenson, 1986. Comparison of forecasting methods for control of potato early blight in Wisconsin. *Plant Disease* 70: 915–920.
- Rodrigues, T. T. M. S., M. L. Berbee, E. G. Simmons, C. R. Cardoso, A. Reis and L. A. Maffia, 2010. First report of *Alternaria tomatophila* and *A. grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. *New Disease Reports*, 22, 28.
- Rotem, J., 1994. The Genus *Alternaria*: biology, epidemiology, and pathology. St Paul, MN: American Phytopathological Society Press.
- Simmons, E. G., 2000. *Alternaria* themes and variations (244-286) species on *Solanaceae*. *Mycotaxon* 75, 1-115.
- Simmons, E. G., 2007. *Alternaria* .An identification manual. CBS Biodiversity Series 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.775 pp
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315–322). San Diego, CA: Academic Press.
- Woudenberg, J. H. C., Truter, M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2014). Large spore *Alternaria* pathogens in section Porri disentangled. *Studies in Mycology*, 79, 1–47.

First Report of Early Blight Caused by *Alternaria linariae* on Potato in Algeria

[D. Ayad](#) ; [B. Hamon](#) ; [A. Kedad](#) ; [Z. Bouznad](#) , and [P. Simoneau](#)

Published Online: 8 Oct 2018 <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-18-0703-PDN> ; Vol. 102, No. 12, December 2018

Potato (*Solanum tuberosum* L.) occupies a leading place in Algerian agriculture, where it is grown over an area of approximately 160,000 ha and can be planted and harvested in virtually any month of the year. However, this production remains threatened by early blight disease caused by *Alternaria* species including *A. solani*, *A. grandis*, and *A. protenta* ([Ayad et al. 2017](#); [Bessadat et al. 2017](#)). High incidences of early blight (up to 80%) have previously been observed in northwestern parts of Algeria on potato as well as tomato ([Bessadat et al. 2017](#)). Potato disease surveys were carried out between 2012 and 2015 with sampling performed in 12 potato-growing regions of Algeria. One hundred sixty-four leaf samples exhibiting typical early blight symptoms (dark elongated or circular lesions with concentric rings surrounded by a yellow halo) were collected. Small pieces (3 to 4 mm²) were cut off from the lesion edges, surface disinfested, and plated on potato dextrose agar medium at 22°C. From the isolates obtained, 82 exhibited morphological characteristics associated with species of *Alternaria* belonging to the section *Porri*. Twenty-two pure cultures were induced to sporulate by plating on V8 medium and incubating for 2 weeks under alternating 12-h darkness and 12-h near-ultraviolet light. Although most of the isolates had typical morphological and sporulation characteristics of *A. solani* and *A. grandis*, five isolates, originating from north Algeria, produced conidia whose body and beak length (up to 108 and 225 µm, respectively) were in the range of those described for *A. linariae* ([Gannibal et al. 2014](#)). For confirmation of the identity of these isolates at the species level, a partial region of the calmodulin (*cal*) gene was amplified using a published primer set ([Gannibal et al. 2014](#)) and sequenced. Maximum-likelihood cluster analysis of the resulting nucleotide sequences (GenBank accession nos. MH243795, MH243769, MH243793, MH243789, and MH243794) and additional reference sequences of species within the section *Porri* confirmed that the five isolates (DA01, DA02, and DA03 from the Tipaza province; and DA06 and DA07 from the Alger province) could be assigned to *A. linariae* with 100% sequence similarity to a reference strain (CBS 109161; GenBank accession no. JQ646254) ([Woudenberg et al. 2014](#)). To confirm pathogenicity of the five *A. linariae* isolates, 3-week-old leaves of susceptible varieties of tomato (Marmande and St Pierre) and potato (Spunta and Sarpomira), cultivated in a pot under greenhouse conditions at 28°C with 16 h/day of light, were inoculated by depositing 20-µl drops of a 10⁴ conidia/ml suspension. Irrespective of the tested plant species and variety, all inoculated leaves showed extending lesions that may reach up to 60% of the leaf area at 21 days postinoculation. No symptom was observed on control plants treated with distilled water. Together with *A. solani*, *A. linariae* is considered the main causal agent of tomato early blight ([Gannibal et al. 2014](#)), but it has never been described on potato. To our knowledge, this is the first report for the occurrence of *A. linariae* on potato. The fact that potato and tomato fields often coexist in close proximity in northwestern Algeria with farmers even using tomato in rotation with potato may favor the development of *A. linariae* on the latter plant species.

First Report of Early Blight Caused by *Alternaria protenta* on Potato in Algeria

[D. Ayad](#) ; [S. Leclerc](#) ; [B. Hamon](#) ; [A. Kedad](#) ; [Z. Bouznad](#) and [P. Simoneau](#)

Published Online: 23 Feb 2017 <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1420-PDN> ; Vol. 101, No. 5
May 2017

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important vegetable crops grown in Algeria. Although less studied than late blight, early blight caused by large-spored *Alternaria* species including *A. solani* and *A. grandis* is an important foliar disease on these crops under Algerian climatic conditions. Over the past few years, this disease became a major constraint on potato production in Algeria and high incidences of early blight (up to 80%) were recorded in the northwestern parts of Algeria ([Bessadat et al. 2016](#)). During 2012 to 2014, surveys were carried out and sampling was performed in 12 potato-growing regions from east to west and from north to south in Algeria. Two hundred and forty-seven samples with typical early blight symptoms (dark, elongated or circular lesions with concentric rings surrounded by a yellow halo) were collected. Two to three lesions per leaf were excised, surface disinfested for 2 min in 0.1% (v/v) sodium hypochlorite solution, and plated on potato dextrose agar medium at 22°C. Twenty-two pure cultures were induced to sporulate by plating on V8 medium and incubating for 2 weeks under alternating 12 h darkness and 12 h near-UV light. Cultural and morphological characteristics of the isolates (color and pigmentation of the culture, shape, and size of the conidia [conidial length and width, beak length]) compared with those in the literature ([Simmons 2007](#)) did not clearly differentiate between the large-spored *Alternaria* species currently reported on potato crops. For identification at the species level, partial regions of the calmodulin (*cal*) and RNA polymerase second largest subunit (*rpb2*) genes were amplified using published primer sets ([Gannibal et al. 2014](#); [Woudenberg et al. 2014](#)) and sequenced. Maximum-likelihood cluster analyses of the resulting nucleotide sequences revealed two isolates (AD82 and AD86 isolated from potato samples collected in the El Oued region) with sequences at the two loci (GenBank accession nos. KX870505 and KX870506 [*cal* locus], KX870507 and KX870508 [*rpb2* locus]) that shared 100% sequence homology to *A. protenta* isolate CBS 116696 (KJ718394, JQ646236) and were thus assigned to this species. *A. protenta* was previously known in Africa only on *Helianthus annuus* ([Simmons 1986](#)), but isolates from *S. tuberosum* and *S. lycopersicum* collected in New Zealand and the U.S.A. and formerly recognized as *A. solani*, were recently moved to *A. protenta* based on phylogeny ([Woudenberg et al., 2014](#)). To confirm pathogenicity of the two *A. protenta* isolates, leaves of susceptible 3-week-old potato plants were inoculated with two 10 µl drops of a 10⁴ conidia/ml suspension. All leaves inoculated with *A. protenta* showed extending lesions that may reach up 50% of the leaf area at 21 days post inoculation. To our knowledge, we report the first occurrence of *A. protenta* as pathogen on potato in Algeria.

Résumé



A. grandis 38 (G02)

RESUME

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) et la tomate (*S. lycopersicum* L.) sont deux cultures solanacées importantes en Algérie. Elles sont réparties différemment dans les différentes zones bioclimatiques du pays et sont conduites selon les différentes pratiques culturelles. Les cultures de pommes de terre occupent des superficies importantes dans plusieurs régions du nord (Ain Defla) au sud (El Oued) et de l'est (Skikda, Guelma) à l'ouest (Mostaganem, Mascara). Au contraire, la tomate est principalement cultivée dans le nord de l'Algérie sur de plus petites surfaces et le plus souvent sous abri plastique comme dans la région de Biskra. Les deux cultures sont souvent cultivées côte à côte ou même en succession dans de nombreuses régions côtières du pays pendant plusieurs années. L'intensification de ces deux cultures sans respect des bonnes pratiques agricoles a conduit au développement de maladies importantes comme l'alternariose.

La présente étude était, d'identifier au niveau de l'espèce les isolats d'*Alternaria* à grandes spores obtenus par des prospections réalisées pendant trois années de culture (2012 – 2015) sur différents champs de pommes de terre et de tomates dans les principales zones bioclimatiques d'Algérie. Comme les symptômes d'alternariose et les caractéristiques morphologiques des isolats ne permettent pas d'établir une distinction nette entre les différentes espèces d'*Alternaria* à grandes spores, l'identification spécifique des isolats a été basée sur la PCR en utilisant des amorces spécifiques, la PCR/RFLP par double digestion enzymatique d'une portion du gène calmoduline et l'analyse de séquence aux gènes calmoduline et RPB2. Cette étude était également menée pour évaluer l'agressivité des isolats sur leurs hôtes respectifs de pomme de terre et de tomate, et de clarifier la spécialisation parasitaire des espèces *Alternaria* à grandes spores par inoculations croisées artificielles *in vitro* et dans des conditions similaires à celles du terrain. Enfin nous nous sommes intéressés à l'étude de la diversité génétique des populations d'*A.solani* en utilisant pour une première fois des marqueurs moléculaires microsatellites. Comme moyens de lutte contre l'alternariose, une analyse des matières actives actuellement utilisées par nos agriculteurs a été aussi effectuée afin de vérifier les niveaux l'efficacité et la présence éventuelle de souches résistantes.

ABSTRACT

Potatoes (*Solanum tuberosum* L.) and tomatoes (*S. lycopersicum* L.) are two important solanaceous crops in Algeria. They are distributed differently in the country's different bioclimatic zones and are conducted according to different cultural practices. Potato crops occupy large areas in several regions from the north (Ain Defla) to the south (El Oued) and from the east (Skikda, Guelma) to the west (Mostaganem, Mascara). On the contrary, tomatoes are mainly grown in northern Algeria on smaller areas and most often under plastic shelter as in the Biskra region. The two crops are often grown side by side or even in succession in many coastal regions of the country for several years. The intensification of these two crops without respect for good agricultural practices has led to the development of important diseases such as early blight.

The present study was to identify at the species level the large spore *Alternaria* isolates obtained by surveys carried out during three years of cultivation (2012 - 2015) on different potato and tomato fields in the main bioclimatic zones of Algeria. As the symptoms of early blight and the morphological characteristics of the isolates do not allow a clear distinction to be made between the different species of *Alternaria* large spored, the specific identification of the isolates was based on PCR using specific primers, PCR/RFLP by double enzymatic digestion of a portion of the calmodulin gene and sequence analysis with calmodulin and RPB2 genes. This study was also conducted to assess the aggressiveness of isolates on their respective potato and tomato hosts, and to clarify the parasitic specialization of *Alternaria* large spore species by artificial cross-inoculation *in vitro* and under conditions similar to those in the field. Finally, we were interested in studying the genetic diversity of *A. solani* populations by using microsatellite molecular markers for the first time in Algeria. As a means of combating early blight, an analysis of the active ingredients currently used by our farmers was also carried out to verify the levels of efficacy and the possible presence of resistant strains.

ملخص

تعد البطاطا (*Solanum tuberosum* L.) والبطاطم (*S. lycopersicum* L.) محصولين مهمين في الجزائر. يتم توزيعها بشكل مختلف في مختلف المناطق المناخية في البلاد وتجرى وفقا للممارسات الثقافية المختلفة. تحتل محاصيل البطاطا مساحات واسعة في عدة مناطق في الشمال (عين الدفلى) من الجنوب (الوادي) والشرق (سكيكدة ، قالمة) من الغرب (مستغانم ، ماسكارا). على العكس من ذلك ، تزرع البطاطم بشكل أساسي في شمال الجزائر في مناطق أصغر ومعظمها تحت مأوى من البلاستيك كما هو الحال في منطقة بسكرة. غالبًا ما يزرع كلا المحصولين جنبًا إلى جنب أو حتى على التوالي في العديد من المناطق الساحلية في البلاد لعدة سنوات. أدى تكثيف هذين المحصولين دون احترام للممارسات الزراعية الجيدة إلى ظهور أمراض مهمة مثل الببتريا.

هدفت الدراسة الحالية إلى التعرف على مستوى الأنواع المعزولة من التوباريا مع جراثيم كبيرة تم الحصول عليها من المسوحات التي أجريت خلال ثلاث سنوات من الزراعة (2012 - 2015) على حقول مختلفة من البطاطا والبطاطم بشكل رئيسي المناطق المناخية في الجزائر. نظرًا لأن أعراض اللطخة المبكرة والخصائص المورفولوجية للعزلات لا تسمح بالتمييز الواضح بين الأنواع المختلفة من البدائل ذات الجراثيم الكبيرة ، فقد كان تحديد النوع المعزول على أساس PCR باستخدام بادئات محددة ، PCR/RFLP عن طريق الهضم الأنزيمي المزدوج لجزء من الجين الهيموديولين وتحليل تسلسل مع الجينات الهوليودولين و RPB2. وقد أجريت هذه الدراسة أيضًا لتقييم عدوانية العزلات على مضيفي البطاطس والبطاطم الخاصين بهم ، ولتوضيح التخصص الطفيلي لأنواع جراثيم *Alternaria* الكبيرة عن طريق التلقيح المتبادل في المختبر وتحت ظروف مماثلة ل الأرض. أخيرًا ، درسنا التنوع الوراثي لمجموعات *A. solani* باستخدام لأول مرة الواسمات الجزيئية للأقمار الصناعية. كوسيلة للسيطرة على *Alternaria* ، تم أيضًا إجراء تحليل للمكونات النشطة التي يستخدمها مزارعونا حاليًا من أجل التحقق من مستويات الفعالية والوجود المحتمل للسلاسل المقاومة.