

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة - الحراش - الجزائر  
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE - EL-HARRACH - ALGER

## *Thèse*

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle

Option : Agro-écosystèmes et Stress Biologiques

## *Thème*

**Contribution à l'étude de la tache auréolée du blé  
causée par *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.)  
Drechs. : Evaluation de la diversité du gène de  
virulence ToxA et recherche des sources de  
résistance à l'égard de la race 1 et la race 5**

Préparée par : OUAAR Noureddine

Soutenu le : 07/11/2021

### Membres de jury

**Président** : Mme. SELLAMI S.

Professeur à l'ENSA, Alger.

**Directrice de thèse** : Mme. BENSLIMANE H.

Professeur à l'ENSA, Alger.

**Examineurs** : Mr. MEFTI M.

Professeur à l'ENSA, Alger.

Mme. AIT-IDIR D.

Maître de Conférences A à l'UMB, Boumerdès.

Mme. BENZINA F.

Maître de Conférences A à l'UMB, Boumerdès.

Année universitaire : 2020/2021

## ***Dédicace***

*Je rends grâce à mon dieu qui m'a permis d'accomplir ce travail et qui m'a redonné courage et patience pour l'achever.*

*Je dédie ce travail à mes très chers parents qui se sont battue pour me bien être, pour leur bienveillance, leur tendance, leur patience, leur courage et leur force qu'ils m'ont transmis pour traverser les plus difficiles épreuves. A mon père qui a tant sacrifié pour nous.*

*« Que le dieu les garde et les protège ».*

*Je dédie aussi ce travail à ma belle-famille ; mes chers frère et sœurs. Leur soutien moral, affectif et matériel durant toutes ces longues années ne m'a jamais fait défaut.*

*« Que dieu vous bénisse et vous gardes pour moi »*

*Je le dédie également à tous les autres membres de ma famille, à mes amis et à mes collègues.*

***Noureddine***

## Remerciements

Je tiens avant tout à remercier le bon Dieu tout puissant de m'avoir donné la force, la volonté et la patience pour achever ce fruit d'un long et modeste travail. Mes parents qui m'ont aidé énormément dans la réalisation de ce travail, ceux qui ont toujours cru en moi dans toutes les circonstances, ils étaient là pour m'aider jusqu'à la fin. Un très grand MERCI.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à ma promotrice Pr. BENSLIMANE Hamida Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'El-Harrach (Alger) pour avoir accepté de m'encadrer, d'avoir proposé et dirigé ce travail ; je la remercie infiniment pour ses importantes remarques, ses orientations et ses conseils, sa disponibilité, sa patience, sa confiance qui ne m'a jamais fait défaut, et sa compréhension durant des moments difficiles tout au long de ce travail ; qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect. Ça m'a fait vraiment plaisir de travailler avec elle, et c'est grâce à elle j'ai appris beaucoup de choses, elle m'a montré comment un chercheur doit être, et dans le futur je ferai de mon mieux pour transférer tout ce que j'ai appris, et j'aiderai tous ceux qui ont besoin d'aide.

Je tiens à remercier et à exprimer ma gratitude au Pr. SELLAMI Samira de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Je tiens également à exprimer mon grand respect et mes vifs remerciements aux membres du jury qui ont accepté de donner de leur temps pour examiner ce travail :

Pr. MEFTI Mohamed de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Dr. AIT-IDIR Djouher et Dr. BENZINA Farida, Maitres de conférences à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdès.

Le présent travail n'a pu aboutir que grâce à l'intervention et à la participation de plusieurs institutions Nationales et Internationales où un groupe de personnes dont le seul intérêt a été de prêter main forte pour faire avancer la science. Je ne peux donc, entamer cette thèse sans exprimer ma gratitude éternelle à tous ceux qui de prêt ou de loin, ont fait aboutir ce travail.

Dr. BENBELKACEM Abdelkader, Maitre de Recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique, d'Algérie, pour nous avoir fourni plusieurs échantillons de blé présentant les symptômes de la maladie

Dr. IMESSOUDENE D., chef département de Biologie à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, Dr. AIT-IDIR D., membre du laboratoire de Biologie moléculaire (responsable de la licence Biologie moléculaire), et Mme BOULDJENNET F., l'ingénieur de laboratoire, pour nous avoir donnée accès au laboratoire de Biologie moléculaire pour faire la première partie de ma thèse. Faiza je te remercie spécialement de m'avoir donné beaucoup d'aide et de m'avoir

accompagné et d'être disponible tout au long de mes travaux de biologie moléculaire dans ce laboratoire.

Dr. Ali Shaukat, du South Dakota State University, USA, pour nous avoir fourni les races de références de *Pyrenophora tritici-repentis* utilisées.

Dr. HAMWIEH Alaa, Coordinateur régional des programmes pour la région de la vallée du Nil et la mer Rouge, l'ICARDA (Egypte) pour son encadrement lors de l'étude de la diversité génétique par les marqueurs moléculaires. Je le remercie aussi pour m'avoir permis d'obtenir de l'ICARDA, le financement qui a assuré en partie mon séjour en Egypte lors de ces travaux. Thank you very much to offer me the opportunity to conduct my last PhD research part at ICARDA.

Mes sincères remerciements s'adressent également à toute l'équipe de l'ICARDA de l'Egypte, Mme. MAHMOUD Sh., Dr. MAHMOUD FOUAD N., Dr. CHAFIK, Peter et Salman, qui ont été toujours avec moi pendant mon séjour pour m'aider, et n'ont jamais hésité à me soutenir, me conseiller, à me donner des remarques et me former. Thank you very much to have always the time for me to conduct my research part at ICARDA, and provide me all facilities and help. You have contributed too much to make my PhD thesis succeed. It was a real pleasure and an honor to interact with you.

Mes remerciements à toute l'équipe et le personnel du département Botanique Fatima, Nesrine, Soumia, Mohamed, Meriem, Arbia, Souhila, Alia, Hind ainsi que mes collègues, Massi, Imène, Safia, Aicha, Nawel, Nesma, Oussama, Mounir, Sabri, Tayeb, Abdenour, Nadhir, Smain, pour toute l'aide qu'ils m'ont offert tout au long de mes travaux.

Je remercie aussi toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

## Liste des abréviations

**AFLP** : Amplified Fragment Length polymorphisme.

**APR** : Adult-Plant Resistance.

**ATMT** : Agrobacterium tumefaciens mediated transformation.

**chl** : chlorose

**ET** : Elément Transposable.

**HST** : Host-Selective Toxin.

**LRR** : Leucine Rich Repeat.

**NBS** : Nucleotide Binding Site.

**NE** : necrotrophic effectors (effecteurs nécrotrophes)

**nec** : nécrose

**NGS** : Next Generation Sequencing.

**NHST** : Non Host Selective Toxins

**ORF** : Open Reading Frame

**QTL** : Quantitative Trait Loci.

**RAPD** : Randomly Amplified Polymorphism DNA.

**RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphism.

**RNA-seq** : RNA sequencing.

**ROS** : Reactive Oxygen Species.

**S/TPK** : sérine/thréonine protéine kinase.

**SCoT** : Start Codon targeted.

**SSR** : Simple Sequence Repeat.

**TIR** : terminal inverted repeats

## Liste des figures

- Figure 1 :** Symptômes typiques du Tan Spot. A : taches nécrotiques sur feuilles ; B : Union des lésions formant de larges plages jaunes sur le limbe foliaire ; C : Taches noires visibles au niveau les lésions .....7
- Figure 2 :** Symptômes typiques du tan spot sur les graines de blé. A : coloration rougeâtre ou rosâtre Red smudge ; B et C : black point sur les graines de blé .....7
- Figure 3 :** Chaumes de blé montrant la formation des pseudothèces .....8
- Figure 4 :** Schéma d'une section transversale dans une feuille de blé illustrant le processus d'infection (Wegulo, 2011). AS : une ascospore en germination ; GT : Tube germinatif ; AP : Appressorium ; PP : Hyphe de pénétration ; ST : Stomates ; ST : le phénomène peut se produire aussi bien au niveau de la surface foliaire supérieure qu'inférieure ; IM : Mycélium à développement intercellulaire.....9
- Figure 5 :** Morphologie de l'agent causal du tan spot *Pyrenophora tritici-repentis*. A : conidies ; B : cellule apicale de la conidie ; C : asque mature contenant 8 ascospores ; D : ascospore mature..... 10
- Figure 6 :** Cycle biologique de *Pyrenophora tritici-repentis*..... 12
- Figure 7 :** Comparaison des interactions génétiques qui se produisent dans le modèle classique du « gène-pour-gène » et le modèle « inverse du gène-pour-gène » impliquent les toxines spécifiques à l'hôte .....23
- Figure 8 :** Régions céréalières prospectées en Algérie durant la saison 2015/2016. 1 : Tizi-Ouzou; 2 : Alger ; 3 : Blida ; 4 : Médéa ; 5 : Sétif ; 6 : Mila ; 7 : Béjaïa ; 8 : Ain Témouchent ; 9 : Bouira; 10 : Boumerdès ; 11 : Tipaza ; 12 : Constantine; 13 : Mascara ; 14 : Ain Defla ; 15 : Guelma. ....40
- Figure 9 :** Dispositif expérimental en Criss-Cross. Le bloc est subdivisé en deux sous-blocs .... 63
- Figure 10 :** Essai en plein champ montrant le stade phonologique de la plante (plein tallage-début montaison), lors de l'inoculation. .... 64
- Figure 11 :** Isolement et identification de l'agent pathogène *P. tritici-repentis*. A : Fructifications au niveau des lésions sur les fragments de feuilles ; B : Conidiophores formés sur les fragments de feuilles ; C : Aspect des conidies formées ; D : Aspect de la germination des conidies ; E : Cellule apicale de la conidie en forme de tête de serpent..... 67
- Figure 12 :** Feuille de blé infectée par *Pyrenophora teres* ..... 68
- Figure 13 :** Aspects culturels des colonies et conidies de *Pyrenophora teres* sur milieu PDA (anamorphe = *Drechslera teres*). ..... 68

<b>Figure 14 :</b> Caractères morphologiques des colonies de <i>P. tritici-repentis</i> montrant différents aspects culturaux ; A : Mycélium épais cotonneux blanc ; B : Mycélium très cotonneux généralement blanc ; C : Mycélium pelucheux vert-gris ; D : Pigmentation de couleur verte ; E : Vieillissement de la colonie ; F : Couleur orange résultante du repiquage répété.....	70
<b>Figure 15 :</b> Moyennes de la croissance mycélienne radiale journalière chez les 97 Isolats à 25 °C, en obscurité sur milieu PDA.....	72
<b>Figure 16 :</b> Comparaison du pouvoir de sporulation des isolats sur milieu V8-PDA (spore/cm <sup>2</sup> ) .....	75
<b>Figure 17 :</b> Visualisation des produits PCR sur gel d'agarose 2 % après amplifications par les marqueurs ITS. 3-47 : Isolats de <i>P. tritici-repentis</i> ; ITS1-ITS15 : Amorces ; M : Marqueur de poids moléculaire (marqueur d'ADN de 100 bp, Vivantis Company) .....	79
<b>Figure 18 :</b> Visualisation des produits PCR sur gel d'agarose 2,5 % après digestion. 3-37 : Isolats de <i>P. tritici-repentis</i> ; <i>Pst</i> I, <i>Hpa</i> II, <i>Xba</i> I : Enzymes de restriction ; M : Marqueur de poids moléculaire (marqueur d'ADN de 100 bp, Vivantis Company) .....	80
<b>Figure 19 :</b> Visualisation des produits PCR sur gel d'agarose 2 % après amplifications par l'amorce SCoT28. 1-12 : Isolats de <i>P. tritici-repentis</i> ; M : Marqueur de poids moléculaire (marqueur d'ADN de 100 bp, Vivantis Company).....	81
<b>Figure 20 :</b> Valeurs moyennes du PIC pour chacune des amorces, et nombre de bandes générées par chacune d'elles.....	82
<b>Figure 21 :</b> Dendrogramme généré sur la base des distances de similarité de Jaccard montrant la classification hiérarchique de l'ensemble des isolats de la collection analysée .....	84
<b>Figure 22 :</b> Visualisation des amplicants générés par l'amorce DTR7 sur gel de polyacrylamide à 9 %. 1-12 : Isolats de <i>P. tritici-repentis</i> ; M : Marqueur de poids moléculaire (marqueur d'ADN de 100 bp, Vivantis Company).....	85
<b>Figure 23 :</b> Valeurs moyennes du PIC pour chacune des amorces (SCoT et SSR), et nombre de bandes générées par chacune d'elles.....	86
<b>Figure 24 :</b> Dendrogramme généré sur la base des distances de similarité de Jaccard montrant la classification hiérarchique de l'ensemble des isolats de la collection analysée .....	87
<b>Figure 25 :</b> Visualisation des ADNs extraits à partir des isolats de <i>P. tritici-repentis</i> sur gel d'agarose de 0,8 % .....	93
<b>Figure 26 :</b> Visualisation des produits d'amplification du gène ToxA sur gel d'agarose de 1,5 % .....	95

<b>Figure 27 :</b> Pourcentage de la présence du gène ToxA chez les isolats des trois pays .....	96
<b>Figure 28 :</b> Alignement des séquences du gène ToxA chez les isolats ayant montrés une variation (I7.8 et I7.9) au niveau du nucléotide 862, celles de deux isolats sans variations de ToxA (16.2 et 16.5) et la séquence de référence de ToxA (AF004369) .....	97
<b>Figure 29 :</b> Alignement des séquences polypeptidiques correspondantes à la toxine Ptr ToxA, traduites à partir des séquences variantes par rapport à la séquence de référence (AF004369).....	97
<b>Figure 30 :</b> Alignement des séquences du gène ToxA retrouvées chez les espèces <i>P. nodorum</i> ; <i>P. avenaria tritici</i> ; <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> ; <i>Bipolaris sorokiniana</i> et celles retrouvées chez les deux isolats algériens ayant montré une variation de séquence (I7.8 et I.79), mettant en évidences les différents haplotypes rapportés par rapports à l'haplotype découvert chez les isolats algériens I7.8 et I7.9.....	98
<b>Figure 31 :</b> Profils de virulence de la race 2 représenté par les symptômes induits par les 2 isolats I7.8 et 7.9. A : Sensibilité du cultivar Glenlea ; B : Sensibilité du cultivar Coulter ; noter les lésions avec nécrose auréolée ; C : Résistance du cultivar 6B-365. D : Résistance du cultivar 6B-662 ; E : Résistance du cultivar Salamouni ; notez la présence de petites taches brunes à noires sur les feuilles .....	105
<b>Figure 32 :</b> Réaction du cultivar Glenlea aux filtrats de culture. A et B : Réaction aux filtrats des deux isolats I7.8 et I7.9 (race 2) ; C : Réaction aux filtrats de Pti2, isolat de référence de la race 1 (témoin positif) ; D : Réaction au milieu de culture Fries (témoin négatif).....	108
<b>Figure 33 :</b> Types de réactions (type de lésions) observées sur les feuilles de blé à l'égard des races 1 et 5 de <i>P. tritici-repentis</i> . Glenlea : Témoin positif montrant la réaction de sensibilité à la race 1, exprimée par des nécroses ; Salamouni : Témoin négatif montrant la réaction de résistance aux deux races 1 et 5, exprimée par des taches noires de taille très réduite ; 1 : Résistant ; 2 : Modérément résistant ; 3 : Modérément résistant/modérément sensible ; 4 : modérément sensible ; 5 : Sensible .....	111
<b>Figure 34 :</b> Pourcentages des génotypes notés pour chaque type de réaction.....	114



## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Réaction de la gamme différentielle vis-à-vis des huit races de <i>P. tritici-repentis</i> ...	13
<b>Tableau II</b> : Type de réaction de la gamme différentielle à l'égard des huit races connues .....	41
<b>Tableau III</b> : Isolats de <i>P. tritici-repentis</i> utilisés pour l'étude de la diversité génétique .....	46
<b>Tableau IV</b> : Composition du volume réactionnel utilisé lors des amplifications.....	48
<b>Tableau V</b> : Amorces SCoT utilisées pour l'étude de la diversité génétique .....	49
<b>Tableau VI</b> : Composition du volume réactionnel utilisé lors des amplifications.....	49
<b>Tableau VII</b> : Amorces SSR utilisées pour la détection de la diversité génétique .....	50
<b>Tableau VIII</b> : Mélange réactionnel utilisé lors des amplifications des gènes pour chaque échantillon.....	54
<b>Tableau IX</b> : Echelle d'évaluation des réactions du blé à l'égard du <i>P. tritici-repentis</i> .....	60
<b>Tableau X</b> : Génotypes de blé évalués en plein champs .....	61
<b>Tableau XI</b> : Caractéristiques des fongicides utilisés .....	62
<b>Tableau XII</b> : Moyennes journalières de la croissance radiale en millimètres des 93 isolats à la température de 25 °C .....	71
<b>Tableau XIII</b> : Moyenne $\pm$ écart type de la croissance mycélienne journalière (mm) pour chacun des 6 jours de mesures .....	73
<b>Tableau XIV</b> : Pouvoir de sporulation <i>in vitro</i> des 93 isolats exprimé par le nombre de spores/cm <sup>2</sup> de culture fongique .....	74
<b>Tableau XV</b> : Présentation des résultats obtenus après amplification des gènes ToxA .....	94
<b>Tableau XVI</b> : Réactions des cinq génotypes de la gamme différentielle modifiée à l'égard des 2 isolats et détermination des races correspondantes.....	105
<b>Tableau XVII</b> : Types de réactions et nombre de génotypes pour chaque réaction, à l'égard des deux races 1 and 5 de <i>P. tritici-repentis</i> .....	112
<b>Tableau XVIII</b> : Réactions des génotypes de blé à l'égard des deux races 1 et 5 de <i>P. tritici-repentis</i> en plein champ .....	116

# Sommaire

INTRODUCTION.....	1
II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	5
II.1. La maladie du Tan spot.....	6
II.1.1. Symptomatologie de la maladie .....	6
II.1.2. Histologie du processus d'infection .....	8
II.2. L'agent causal de la tache auréolée .....	9
II.2.1. Position taxonomique .....	9
II.2.2. Biologie du champignon .....	9
II.2.3. Gamme d'hôte .....	10
II.2.4. Epidémiologie .....	11
II.2.5. Différentes races du pathogène .....	12
II.2.6. Toxines produites par <i>P. tritici-repentis</i> .....	14
II.2.6.1. La toxine Ptr ToxA.....	15
II.2.6.2. La toxine Ptr ToxB .....	17
II.2.6.3. La toxine Ptr ToxC .....	18
II.2.7. Variabilité du <i>P. tritici-repentis</i> .....	19
II.2.7.1. La variabilité physiologique ou pathogénique.....	19
II.2.7.2. Variabilité génétique.....	20
II.3. La relation du gène pour gène dans l'interaction blé/ <i>P. tritici-repentis</i> .....	21
II.4. Les moyens de lutte contre <i>P. tritici-repentis</i> .....	22
II.4.1. La lutte culturale.....	22
II.4.2. La lutte chimique.....	24
II.4.3. La lutte biologique .....	25
II.4.4. La lutte génétique .....	25
II.5. Transfert horizontal du gène ToxA chez <i>P. tritici-repentis</i> , une cause de l'émergence de nouvelles maladies.....	26
II.6. Mécanismes héréditaires de l'interaction blé/ <i>P. tritici-repentis</i> .....	28
II.6.1. Les gènes responsables de la sensibilité du blé au <i>P. tritici-repentis</i> .....	29
II.6.1.1. Le gène <i>Tsn1</i> .....	29
II.6.1.2. Le gène <i>Tsc2</i> .....	30
II.6.1.3. Le gène <i>Tsc1</i> .....	31
II.6.2. La résistance qualitative (monogénique).....	31
II.6.3. La résistance quantitative .....	32
II.6.4. Sources de résistance chez le blé, à l'égard du <i>P. tritici-repentis</i> .....	33
II.7. Approches moléculaires utilisées pour l'étude des gènes de virulence .....	34

II.8. Aperçus des marqueurs moléculaires utilisés pour l'analyse de la diversité génétique des champignons phytopathogènes.....	37
III. MATERIEL ET METHODES .....	39
III.1. Matériel.....	40
III.1.1. Matériel fongique.....	40
III.1.2. Matériel végétal .....	41
III.2. Méthodes .....	42
III.2.1. Isolement monospore du pathogène.....	42
III.2.2. Conservation en disques de gélose séchés .....	42
III.2.3. Caractérisation morphologique des isolats .....	42
III.2.4. Etude de la croissance mycélienne des isolats.....	43
III.2.5. Evaluation du pouvoir de sporulation des isolats <i>in vitro</i> .....	43
III.2.5.1. Induction de la sporulation.....	43
III.2.5.2. Préparation des suspensions de spores .....	44
III.2.5.3. Comptage des spores et analyses statistiques.....	44
III.2.6. Analyse de la diversité génétique des isolats <i>P. tritici-repentis</i> par les marqueurs moléculaires .....	44
III.2.6.1. Culture des isolats .....	44
III.2.6.2. Extraction d'ADN .....	45
III.2.6.3. Evaluation de la qualité et de la quantité de l'ADN extrait .....	46
III.2.6.4. Sélection des marqueurs moléculaires utilisés lors l'analyse de la diversité génétique .....	47
III.2.6.5. Analyse de la diversité génétique par les marqueurs SCoT (Start Codon targeted) .....	48
A. Mélange réactionnel.....	48
B. Amorces .....	48
III.2.6.6. Analyse de la diversité génétique par les marqueurs SSR (simple Sequence Repeat) .....	49
A. Mélange réactionnel.....	49
B. Amorces SSR utilisées, leurs séquences respectives et leurs températures d'hybridation .....	50
C. Séparation des produits amplifiés sur gel de polyacrylamide.....	51
D. Visualisation des produits amplifiés (SSR) .....	51
III.2.6.7. Analyse des données générées par les marqueurs moléculaires .....	52
A. Collecte des données et construction de la matrice binaire.....	52
B. Analyse hiérarchique.....	52
C. Polymorphism information content (PIC).....	52
III.2.7. Etude de la variabilité génétique du gène ToxA.....	53

III.2.7.1. Culture des isolats et extraction de l'ADN.....	53
A. Extraction d'ADN .....	53
B. Evaluation de la quantité et de la qualité de l'ADN extraite.....	54
III.2.7.2. Amplification par PCR des gènes ToxA .....	54
A. Mélange réactionnel.....	54
B. Amorces utilisées .....	55
C. Programme d'amplification .....	55
D. Visualisation des produits PCR .....	55
III.2.7.3. Séquençage des produits d'amplification.....	55
III.2.7.4. Analyses des séquences obtenues .....	56
III.2.8. Identification du type de races des isolats ayant montrés une variation de ToxA .....	56
III.2.8.1. Préparation des plants.....	56
III.2.8.2. Préparation de l'inoculum .....	57
III.2.8.3. Inoculation.....	57
III.2.9. Analyse de la réaction de la variété Glenlea aux filtrats de culture des isolats ayant montré une variation du gène ToxA .....	58
III.2.9.1. Préparation des filtrats de culture .....	58
III.2.9.2. Infiltration des feuilles de blé.....	59
III.2.10. Recherche des sources de résistance à l'égard de la race 1 et de la race 5 de <i>P. tritici-repentis</i> par inoculation artificielle .....	59
III.2.10.1. Evaluation de la réaction à la maladie sous conditions contrôlées .....	59
III.2.10.2. Essai de confirmation des réactions de résistance.....	60
III.2.10.3. Evaluation de la réaction à la maladie en plein champs.....	60
A. Installation des essais.....	62
B. Traitements fongicides préventifs.....	62
C. Préparation de l'inoculum et inoculation.....	64
D. Evaluation de la réaction des génotypes inoculés à la maladie .....	64
IV. RESULTAT ET DISCUSSION.....	65
IV.1. Prospection et construction de la collection .....	66
IV.2. Caractérisation morphologique des isolats.....	69
IV.3. Etude de la croissance mycélienne des isolats .....	69
IV.4. Evaluation du pouvoir de sporulation des isolats <i>in vitro</i> .....	73
IV.5. Analyse de la diversité génétique des isolats de <i>P. tritici-repentis</i> par les marqueurs moléculaires.....	78
IV.5.1. Evaluation de la qualité et de la quantité de l'ADN extrait.....	78
IV.5.2. Sélection des marqueurs moléculaires pour l'analyse de la diversité génétique .....	79
IV.5.3. Analyse de la diversité génétique par les marqueurs SCoT .....	81

IV.5.4. Analyse de la diversité génétique par les marqueurs SSR.....	85
IV.5.5. Analyse globale de la diversité génétique par les marqueurs SCoT et SSR.....	85
IV.6. Etude de la variabilité génétique du gène ToxA .....	92
VI.6.1. Amplification du gène ToxA .....	92
IV.7. Analyse des séquences des gènes ToxA chez les isolats sélectionnés. ....	96
IV.8. Identification des races des isolats ayant montré une variation de ToxA .....	104
IV.9. Réaction de la variété Glenlea au filtrat de culture des isolats mutés .....	107
IV.10. Analyse de la réaction des blés à l'égard de la maladie du tan spot.....	109
IV.10.1. Evaluation de la réaction à la maladie sous conditions contrôlées .....	109
IV.10.2. Evaluation de la réaction à la maladie en plein champs .....	115
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	126
VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	131
ANNEXES .....	170

---

# **I- Introduction**

---

Les céréales occupent une place primordiale dans l'alimentation humaine : leurs grains ainsi que leurs dérivées, constituent l'alimentation de base dans beaucoup de pays, particulièrement en Afrique du Nord (Djermoun, 2009). Par voie de conséquent, elles ont un intérêt particulier dans les programmes de recherches agronomiques à l'échelle mondiale.

Le blé est parmi les céréales les plus cultivées et consommées dans le monde ; il constitue la première ressource en alimentation humaine et la principale source d'énergie et de protéines. L'importance des surfaces consacrées à cette culture sur la planète dépassent celles de toutes les autres cultures. Il occupe une superficie mondiale d'environ 217 millions d'hectares avec une production de 765 millions de tonnes en 2020 (USDA, 2020). Sa demande devrait augmenter à un taux de 1,6 % par an jusqu'en 2050 en raison de l'accroissement de la population et de la prospérité (Singh *et al.*, 2016).

En Algérie, les deux espèces de blé (blé dur et blé tendre) sont les plus importantes, elle s'étend sur presque 2 Mha. En dépit d'une demande accrue en blé qui représente une composante majeure dans l'alimentation humaine et animale, l'Algérie enregistre chaque année un déficit de production qui équivaut à l'ordre de 3,9 Million de tonnes en 2019 et un rendement moyen d'environ 19 Q/ha. La production du blé reste toujours faible, très irrégulière et insuffisante pour couvrir les besoins nationaux en consommation. Des besoins comblés chaque année par des importations ; le blé reste ainsi toujours le premier produit agricole importé (Kellou, 2008 ; Kheyar *et al.*, 2007 ; Bessaoud *et al.*, 2019). La faible production du blé est due à divers stress abiotiques ou biotiques ; les plus importants sont les pratiques culturales, les aléas climatiques, les adventices, les insectes et les maladies. Ces contraintes peuvent affecter à la fois la qualité et la quantité du blé produit. En effet, en Algérie, les stress biotiques, et plus précisément les maladies, constituent l'un des facteurs limitant et dépressif sur cette culture, et entraînent chaque année des pertes économiques importantes (Aouali et Douici-Khalfi, 2009).

Ainsi, de nombreuses maladies foliaires ont été observées sur la culture du blé, notamment celles causées par les champignons. Les prospections réalisées ont montré l'existence abondante de la tache auréolée qui est largement distribuée dans les régions céréalières (Benslimane, 2012 ; Bendif, 1994).

La maladie de la tache auréolée, appelée également la tache bronzée ou "tan spot" pour les anglo-saxons, qui est causée par le champignon *Pyrenophora tritici-repentis* Drechs. (anamorphe : *Drechslera tritici-repentis* (Sacc.) Shoem.), est l'une des principales maladies foliaires du blé dans le monde ; elle cause des pertes de rendement au champ qui peuvent atteindre 50 % sous certaines conditions (Rees et Platz, 1983 ; Shabeer et Bockus, 1988), ce qui

a attiré l'attention de plusieurs équipes de recherche, dont les travaux de recherche ont débuté durant les années 70s aux USA et en Australie. Toutefois, la découverte d'une toxine spécifique à l'hôte a été très décisive pour l'évolution des recherches relatives à ce pathosystème.

La maladie du tan spot présente deux symptômes distincts, la nécrose et la chlorose, sur les cultivars de blé sensibles. Ces symptômes sont induits par la synthèse de trois toxines spécifiques à l'hôte : Ptr ToxA, Ptr ToxB et Ptr ToxC. La synthèse de ces toxines est sous le contrôle des gènes de virulence ToxA, ToxB et ToxC respectivement ; seuls ToxA et ToxB ont été jusqu'à présent clonés, étudiés et caractérisés. Selon les recherches, ce champignon comporte huit races réparties à travers le monde ; leur classification est basée sur la production de ces trois toxines.

Les stratégies de gestion des maladies et des parasites du blé comprennent l'utilisation de la résistance de l'hôte, les produits chimiques, les pratiques culturales, la lutte biologique et la gestion intégrée des maladies (Singh *et al.*, 2016). Le moyen de lutte le plus approprié et le plus durable, reste toutefois l'utilisation de variétés résistantes. La recherche de sources de résistance à l'égard des populations pathogènes locales est donc primordiale. La complexité de la structure des populations pathogènes dans les champs algériens, impose une recherche ciblée des sources de résistance qui prend en considération le type de races présent, et la prépondérance de celles-ci. En Algérie, 6 races ont été signalées (1, 4, 5, 6, 7 et 8) avec prédominance de la race 1 (Benslimane *et al.*, 2011), un représentant typique du gène de virulence ToxA. La race 5 est également retrouvée (Lamari *et al.*, 1995 ; Benslimane *et al.*, 2011) et l'Algérie fait partie des rares régions dans le monde où elle a été identifiée, il s'agit du représentant typique du gène de virulence ToxB. En absence de variété résistantes connues et en raison de la grande sensibilité des variétés communément cultivées à la maladie en Algérie, la nécessité de focaliser une recherche de sources de résistance à l'égard de ces deux races nous a semblé une priorité en Algérie.

Cependant la sélection et l'utilisation efficace des génotypes résistants, nécessitent une bonne connaissance de l'agent causal, de sa diversité et de celle des facteurs de virulence de l'agent causal. Parmi les facteurs de virulence chez le *P. tritici-repentis*, le gène ToxA, est l'un des deux gènes de virulence chez cette espèce clonée et bien caractérisé. ToxA semble être très conservé chez les isolats collectés à partir de différentes régions géographiques du monde (Ballance *et al.*, 1996 ; Friesen *et al.*, 2006 ; Oliver et Solomon, 2008). Les résultats de ces travaux et jusqu'au moment du début de ceux de cette thèse, ont montré qu'il n'y avait aucune variabilité de ce gène, toutefois, ces travaux n'ont pas inclus les régions importantes de production des céréales qui sont l'Afrique du Nord et le Moyen Orient. La proximité de l'Afrique du Nord et du Moyen Orient, du croissant fertile, nous laisse supposer que les populations pathogènes auraient connues une



évolution différente. Par voie de conséquences les facteurs de virulence auraient connus une diversité plus importante que celle déjà décrite, basée uniquement sur l'étude des populations pathogènes d'Amérique du nord et d'Australie.

ToxA pourrait présenter une variation dans les régions d'Afrique du nord et du moyen orient, notamment en Algérie. Les conséquences d'une telle situation seraient très importantes sur le pathosystème, augmentent sa complexité et les dégâts dont la maladie est à l'origine. En effet, une variabilité au niveau du gène peut induire l'apparition de nouvelles toxines et/ou de nouvelles races non encore identifiées, et orienterait ainsi, nécessairement notre contrôle de cette maladie sur des bases nouvelles. Ainsi, L'efficacité de l'utilisation des variétés résistantes à cette maladie doit impérativement respecter le type de facteurs de virulence présents dans la région de culture.

C'est dans cette problématique que s'inscrit notre travail qui s'est fixé comme objectifs principaux ; L'étude de la variabilité du gène de virulence ToxA chez une collection d'isolats de *P. tritici-repentis* originaires d'Afrique du Nord (Algérie et Tunisie) et du Moyen Orient (Syrie), et la recherche de sources de résistance à l'égard des deux races 1 et 5, aussi bien pour le blé dur que le blé tendre.

A cet effet, la réalisation de nos objectifs a nécessité de poursuivre la démarche scientifique suivante :

1. Une prospection des différentes zones céréalières du pays et une collecte d'échantillons de blé dur et de blé tendre présentant les symptômes typiques de la maladie.
2. L'isolement du champignon et la constitution d'une collection d'isolats algériens de *P. tritici-repentis*, ajoutée à une autre collection d'isolats algériens, tunisiens et syriens déjà prêle depuis des travaux antérieurs.
3. La caractérisation morphologique et physiologique de l'ensemble des isolats algériens obtenus suite aux isollements.
4. L'étude de la diversité génétique de ces isolats de *P. tritici-repentis* en utilisant les marqueurs SCoT (Start Codon Targeted) et SSR (Simple Sequence Repeat).
5. L'étude de la variabilité du gène de virulence ToxA chez une collection d'isolats de *P. tritici-repentis* originaire d'Afrique du Nord (Algérie et Tunisie) et du Moyen Orient (Syrie).
6. La recherche des sources de résistance à l'égard des races 1 et 5, aussi bien chez le blé dur que le blé tendre, en conditions contrôlées, puis en plein champ pour confirmation.

---

## **II-Synthèse Bibliographique**

---

## **II.1. La maladie du Tan spot**

C'est une maladie foliaire du blé connue aussi sous le nom de la maladie de la tache auréolée ou la maladie de la tache bronzée. Elle est économiquement importante, surtout dans les régions productrices de blé dans le monde (Hosford, 1982). Elle peut induire des pertes qui sont dues généralement à la réduction de la surface photosynthétique des feuilles ; ces pertes peuvent atteindre 50 %, elles varient selon le génotype du blé, la virulence de l'agent pathogène, le stade de croissance et l'environnement favorables pour le développement de la maladie (Rees et Platz, 1983). Bien que des pertes d'environ 15 % soient plus courantes (Moffat et Santana, 2018). L'effet sur le rendement étant le plus important lors du remplissage du grain, en particulier si les feuilles supérieures sont touchées (Moffat et Santana, 2018).

L'agent pathogène responsable de la maladie a été signalé pour la première fois en 1850 en Allemagne sur *Agropyron repens* (Diedicke, 1902), mais il a été signalé pour la première fois sur le blé au Japon (Nisikado, 1928) et peu après au Canada (Connors, 1937) et en Inde (Mittra, 1934). Par la suite, la maladie a été observée en Australie, aux États-Unis et dans de nombreux autres pays producteurs de blé (De Wolf *et al.*, 1998 ; Rees et Platz, 1983). Bien que la maladie ait été observée sur le blé dans les années 1920, elle n'a pas été considérée comme une maladie majeure ou une menace potentielle pour la production de blé avant les années 1970 (De Wolf *et al.*, 1998 ; Hosford, 1982 ; Moreno *et al.*, 2012).

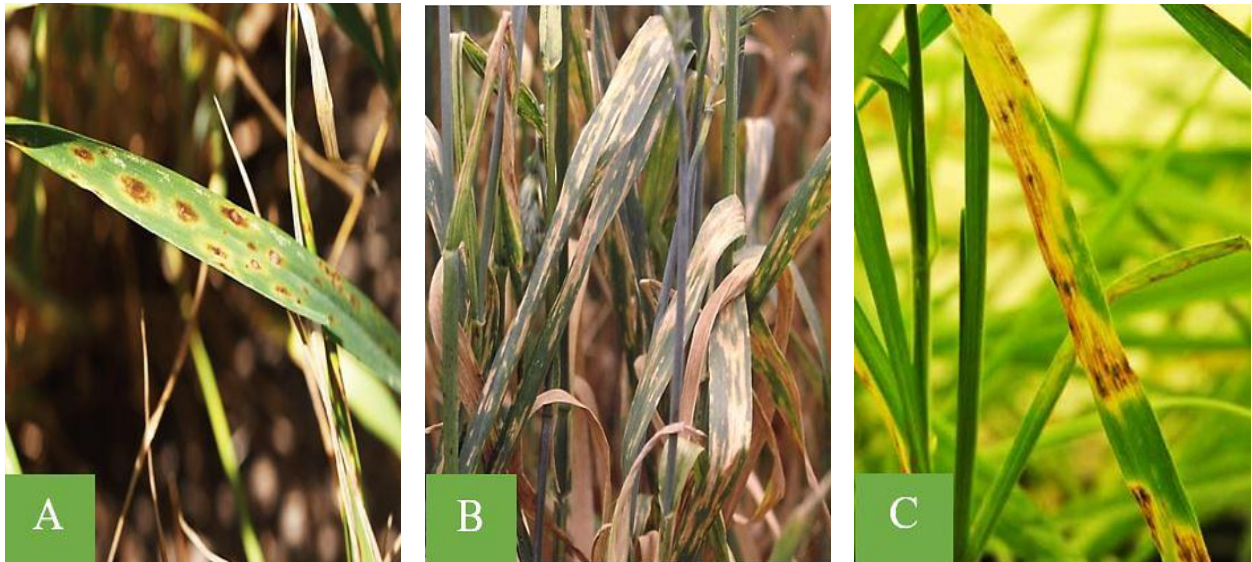
### **II.1.1. Symptomatologie de la maladie**

Initialement, le champignon produit des taches nécrotiques de forme ovale avec un halo chlorotique centré par une petite tache noire sur les feuilles des génotypes de blé sensibles (Fig. 1.A) (De Wolf *et al.*, 1998 ; Engle *et al.*, 2004). Au fur et à mesure de la progression de la maladie, ces taches augmentent de taille et peuvent s'unir pour former de larges plages jaunâtres, induisant ainsi la mort des feuilles par la suite (Fig. 1.B et 1.C) (Engle *et al.*, 2004 ; Moffat et Santana, 2018). L'attaque de cette maladie est particulièrement sévère sur les feuilles âgées ; des feuilles entières, des épis et des plantes entières peuvent également être touchés (Moffat et Santana, 2018).

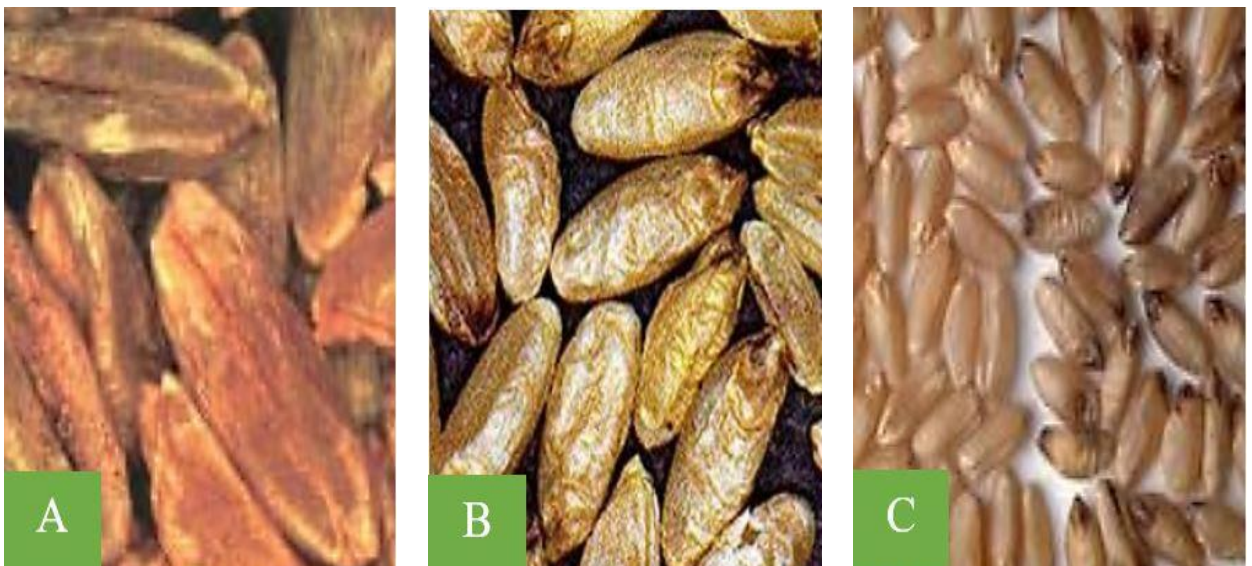
Il peut infecter les graines de blé pendant le stade de remplissage des grains, généralement après de longues périodes d'humidité élevée (Schilder et Bergstrom, 1994). Les graines infectées présentent des taches de coloration rouges (Moffat et Santana, 2018) ou roses (Fernandez *et al.*, 1994) qu'on appelle communément « red smudge » (Fig. 2.A). Cette coloration peut affecter la qualité du grain, et provoque le déclassement des céréales sur le marché (Schilder et Bergstrom,

1990 ; Fernandez *et al.*, 1994). L'infection des graines peut également apparaître sous forme d'un symptôme connu par la nomination de « black point of wheat » (Francl et Jordahl, 1992), celui-ci est exprimé par de petits points noirs recouvrant la graine (Fig. 2.B et 2.C).

A la maturité de la culture, le champignon envahit les tiges (chaumes) où il produit de minuscules structures fructifères noires appelées pseudothèces (Fig. 3) (Wegulo *et al.*, 2006).



**Figure 1 :** Symptômes typiques du Tan Spot. **A :** taches nécrotiques sur feuilles (Wegulo *et al.*, 2006) ; **B :** Union des lésions formant de larges plages jaunes sur le limbe foliaire (McMullen, 2003) ; **C :** Taches noires visibles au niveau les lésions (Moffat et Santana, 2018).



**Figure 2 :** Symptômes typiques du tan spot sur les graines de blé. **A :** coloration rougeâtre ou rosâtre Red smudge (McMullen, 2003) ; **B et C :** black point sur les graines de blé (De Wolf, 2008).



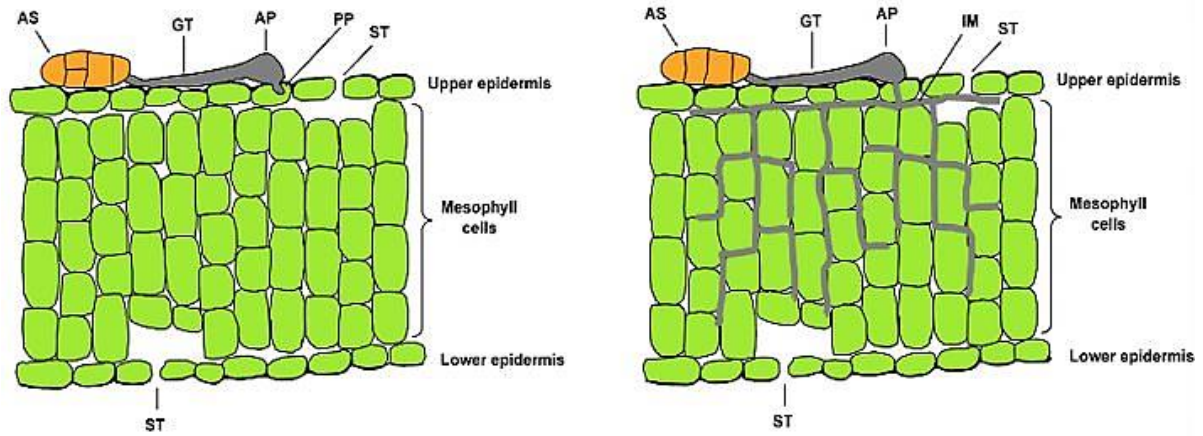
**Figure 3 :** Chaumes de blé montrant la formation des pseudothèces (Moffat et Santana, 2018).

### II.1.2. Histologie du processus d'infection

Le taux de germination des conidies et la formation de l'appressorium dépendent des conditions environnementales (Amaike *et al.*, 2008).

Au printemps, les ascospores de *P. tritici-repentis* tombent sur la feuille de blé, chaque conidie germe pour donner naissance à plusieurs tubes germinatifs qui forment par la suite des appressoria au niveau des cellules épidermiques et stomatiques (Dushnicky *et al.*, 1998). A partir de chacun de ces appressoria un hyphe se développe et pénètre les cellules épidermiques, et par la suite se développe vers les autres couches de cellules du mésophile en colonisant les espaces intercellulaires (Lamari et Bernier, 1989a). Une fois dans les cellules, des phytotoxines agissent sur les différents organites cellulaires (Lamari *et al.*, 1995) (Fig. 4).

Au cours du processus de pénétration fongique, la pression mécanique et les réactions enzymatiques sont impliquées. L'ensemble du processus de pénétration est normalement terminé dans les 3 heures qui suivent l'arrivée de la spore à la surface de la feuille (Dushnicky *et al.*, 1996). Le processus d'infection des semences est semblable à celui des feuilles. Cependant, après l'infection, le champignon a accès à la graine suite à l'infection de l'épi via la glume, le lemme ou la paléole (Schilder and Bergstrom, 1994).



**Figure 4 :** Schéma d'une section transversale dans une feuille de blé illustrant le processus d'infection (Wegulo, 2011). **AS** : une ascospore en germination ; **GT** : Tube germinatif ; **AP** : Appressorium ; **PP** : Hyphe de pénétration ; **ST** : Stomates ; **ST** : le phénomène peut se produire aussi bien au niveau de la surface foliaire supérieure qu'inférieure ; **IM** : Mycélium à développement intercellulaire.

## II.2. L'agent causal de la tache auréolée

L'Agent causal de la tache auréolée du blé est le champignon *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. dont l'anamorphe est *Dreschlera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker (sym. *Helminthosporium tritici-repentis* (Died)) (Hosford, 1982 ; Dubin, 1983). Le *P. tritici-repentis* est communément abrégé en *Ptr*. Il a été isolé la première fois par Diedicke à partir de *Agropyron repens* en Allemagne et déterminé initialement comme *Pleospora trichostoma* et par la suite il l'a nommé *Pleospora tritici-repentis* (Diedicke, 1904). Puis il a été isolé à partir du blé en 1928 par Nisikado (Nisikado, 1928).

### II.2.1. Position taxonomique

Le champignon *P. tritici-repentis* (Died) Drechs., est classé dans le règne des Fungi, division des Eumycota, subdivision des Ascomycota, classe des Dothideomycètes, sous-classe des Pleosporomycetidae, ordre des Pleosporales, la famille des Pleosporaceae (Mycobank, 2021 ; Ainsworth *et al.*, 1973).

### II.2.2. Biologie du champignon

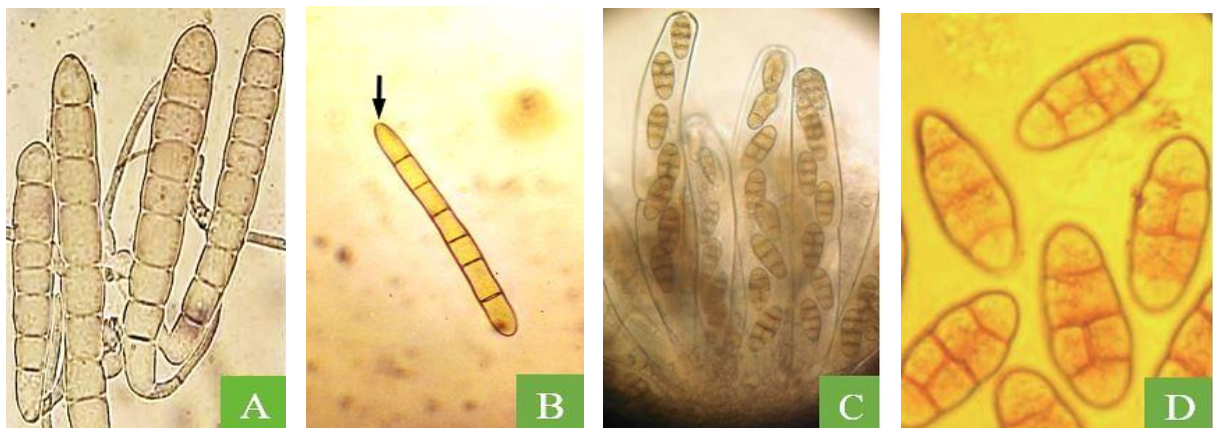
Le *P. tritici-repentis* est un ascomycète homothallique (Momeni *et al.*, 2014), donc les deux formes de reproductions sont présentes et connues chez ce champignon. L'une est sexuée par la production d'ascospores et l'autre asexuée par la production de conidies.

La forme asexuée ou l'anamorphe est *D. tritici-repentis* (Died.) Shoem. Pendant cette phase, le champignon produit des conidiophores de couleur brun foncé, cylindriques, droits, cloisonnés, à une base gonflée, et mesurent 10-400 µm x 6-8 µm (Schilder and Bergstrom, 1993). Les

conidies sont de couleur grise jaunâtre pâle, cylindriques, mesurent 80-170 µm x 12-24 µm, elles sont subhyalines possèdent 1 à 9 cloisons transversales, elles mesurent 80 à 250 µm de longueur, 14 à 20 µm de diamètre (la partie la plus large) et 2 à 4 µm de diamètre à la base (Zillinsky, 1983) (Fig. 5.A) (Zillinsky, 1983). La cellule apicale a la forme d'un cône au sommet arrondi, ce qui lui donne l'aspect d'une tête de serpent (Zillinsky, 1983) (Fig. 5.B).

La forme sexuée ou le téléomorphe est *P. tritici-repentis* (Died.) Drechs.. Elle constitue la source d'inoculum primaire par la production d'ascospores. Les ascospores sont produites dans des asques à l'intérieur d'un pseudothèce (Summerell et Burgess, 1989). Les pseudothèces sont noirs, en saillie, ornés de poils situés autour d'un court col mesurant de 200-700 µm x 0,2-0,35 mm, elles se développent sur les vieux chaumes de blé (Pfender *et al.*, 1988) (Fig. 3).

Les ascospores matures sont brun jaunâtre, ovoïdes, munies de trois cloisons transversales, et d'une ou de deux longitudinales. Elles mesurent 40-60 µm de long et 18-25 µm de large (Zillinsky, 1983) (Fig. 5.C et 5.D).



**Figure 5 :** Morphologie de l'agent causal du tan spot *Pyrenophora tritici-repentis*. Phase asexuée : **A** : conidies (Zillinsky, 1983); **B** : cellule apicale de la conidie. Phase sexuée : **C** : asque mature contenant 8 ascospores (Benslimane, 2014) ; **D** : ascospore mature (Benslimane, 2014).

### II.2.3. Gamme d'hôte

La gamme d'hôtes est essentiellement la liste des espèces de plantes qui peuvent être parasitées par ce champignon (Dinoor, 1974).

*P. tritici-repentis*, en plus de son hôte principal, possède une large gamme d'hôte composée d'au moins 26 espèces de graminées (Krupinsky, 1992a). En effet , ce champignon a été isolé d'un certain nombre d'autres espèces dont l'orge (*Hordeum vulgare*), l'avoine (*Avena sativa*) et le seigle (*Secale cereale*), ainsi que d'autres espèces comme *Alopecurus arundinaceus*, *Andropogon gerardi*, *Avenafatua*, *Avena sativa*, *Bromus inermis*, *Dactylis glomerata*, *Echinochloa* sp., *Elymus innovatus*, *Hordium vulgare*, *Lolium perenne*, *Phalaris arundinaceae*, qui peuvent servir

de sources d'inoculum (Dreschler, 1923 ; Hosford, 1971 ; Howard et Morrall, 1975 ; Farr *et al.*, 1989 ; Krupinsky, 1992a, b ; Ali et Francl, 2003). Krupinsky (1992a) a pu isoler 62 isolats de *P. tritici-repentis* de 25 espèces de graminées et ils étaient tous pathogènes sur le blé. Les mêmes résultats ont été trouvés par Krupinsky (1992b) qui a pu isoler 87 isolats à partir de différentes espèces de graminées et d'orge. Lorsque leur pathogénicité a été évaluée sur le blé, la variation de leur agressivité a indiqué que d'autres hôtes pourraient être une source potentielle de variation génétique dans la population de l'agent pathogène (Krupinsky, 1992b).

Dans une autre étude réalisée par Ali et Francl (2001), dix isolats de *P. tritici-repentis* ont été obtenus à partir de l'orge, et ont été tous caractérisés comme étant de race 1.

#### **II.2.4. Épidémiologie**

Le cycle de la tache auréolée du blé, implique les deux modes de reproduction sexuée et asexuée. La phase sexuée est caractérisée par la production d'ascospores (Schilder et Bergstrom, 1992), la phase asexuée est caractérisée par la production de conidies.

*P. tritici-repentis* survit entre deux saisons de cultures en se développant saprophytiquement sur les chaumes de blé sous forme de pseudothèces, contenant les ascospores matures (Krupinsky, 1992b). Il infecte ainsi les feuilles des jeunes plantes à proximité (Ciuffetti *et al.*, 2014), les résidus de culture, les graminées spontanées et les graines infestées (Schilder et Bergstrom, 1990). La production des pseudothèces semble être dépendante des conditions de l'environnement ; des conditions d'humidité optimale avec des températures modérées (15-18 °C) sont nécessaires pour la maturation des pseudothèces, et pour la production optimale d'ascospores (Pfender *et al.*, 1988).

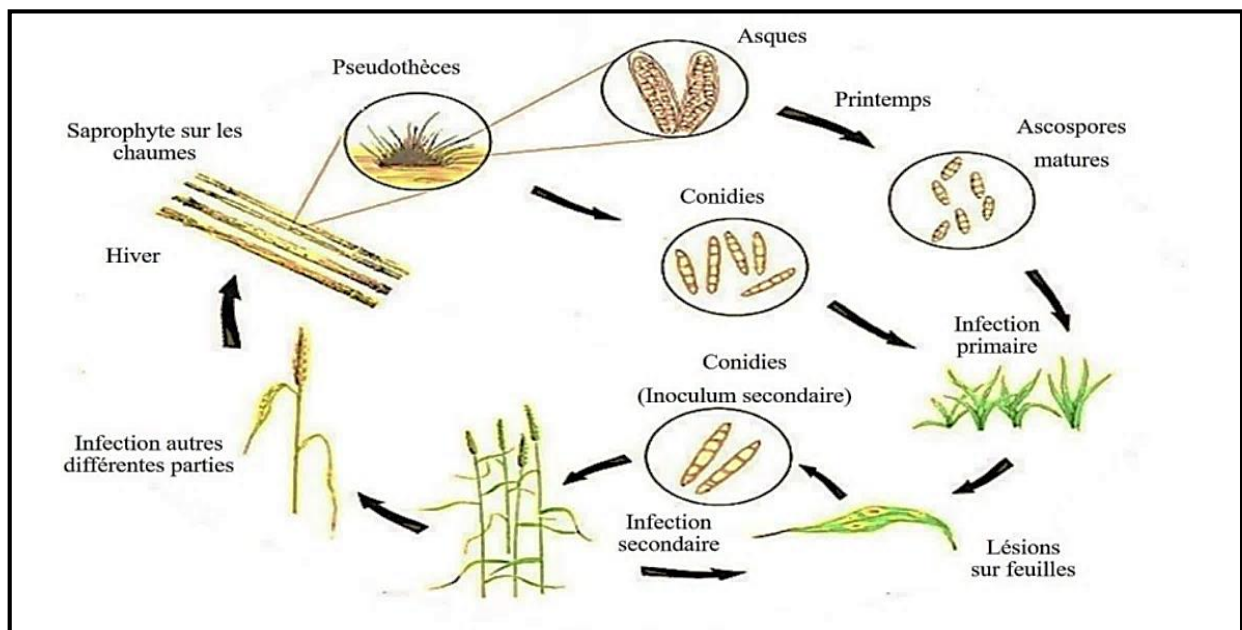
Au printemps en présence de l'humidité, ces pseudothèces libèrent les ascospores (Hosford, 1971). Ils sont dispersés dans les cultures à longue distance par le vent et la pluie, (Schilder et Bergstrom, 1992) pouvant ainsi parcourir jusqu'à 200 km (De Wolf *et al.*, 1998). Elles sont à l'origine d'épidémies localisées et de la propagation de la maladie (Schilder et Bergstrom, 1992). Ainsi, les épidémies sont caractérisées par une infection primaire par les ascospores (Krupinsky, 1982 ; Moffat et Santana, 2018). Les feuilles inférieures, plus matures, sont généralement infectées en premier, ensuite la maladie progresse, pour affecter les feuilles supérieures et les gaines foliaires lorsque les conditions sont favorables (Moffat et Santana, 2018).

Cette infection primaire par les ascospores est suivie par plusieurs infections secondaires provoquées par les conidies (Ciuffetti *et al.*, 2014 ; Moffat et Santana, 2018). La sporulation, la germination des conidies et l'infection des tissus sont conditionnées par l'humidité, la



température, la lumière, l'âge de la plante ou la position des feuilles, le génotype de l'hôte et la virulence de l'isolat (Ciuffetti et Tuori, 1999).

Même si les infections foliaires sont les plus courantes (Moffat et Santana, 2018), *P. tritici-repentis* peut être transmis par la semence ; lorsque la graine est contaminée, le pourcentage du passage du champignon à la nouvelle plantule est presque de 100% (Schilder et Bergstrom, 1992). Toutefois le développement de l'épidémie du Tan spot par cette dernière voie, n'est pas connue (Fernandez *et al.*, 1998), la transmission du champignons serait limitée uniquement au coléoptile et non pas aux feuilles (Fernandez *et al.*, 1996).



**Figure 6 :** Cycle biologique de *Pyrenophora tritici-repentis* (Ciuffetti *et al.*, 2014).

### II.2.5. Différentes races du pathogène

Initialement, les isolats de *P. tritici-repentis* ont été classés par Lamari et Bernier (1989b) en 4 pathotypes basés sur deux symptômes distincts ; la nécrose (nec+) et la chlorose (chl+). Les isolats étaient ainsi désignés comme pathotype 1 (nec+chl+), pathotype 2 (nec+chl-), pathotype 3 (nec-chl+), et pathotype 4 (nec-chl-).

Par la suite, Lamari *et al.* (1995) ont proposé un système de classification fondé sur la notion de race, où les pathotypes 1 à 4 étaient désignés comme les races 1 à 4. Les huit races actuellement connues (Lamari *et al.*, 1995 ; Lamari *et al.*, 2003 ; Lamari et Strelkov, 2010) peuvent être identifiées tout comme dans la première classification par la réaction des isolats sur la gamme différentielle, composée de quatre génotypes de blé tendre ; Glenlea, 6B365, 6B662 et Salamouni, selon le type de lésions (Lamari et Bernier, 1991) comme indiqué dans le tableau I.

**Tableau I** : Réaction de la gamme différentielle vis-à-vis des huit races de *P. tritici-repentis*.

Génotype	Races							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Glenlea</b>	S (N)	S (N)	R	R	R	R	S (N)	S (N)
<b>6B662</b>	R	R	R	R	S (C)	S (C)	S (C)	S (C)
<b>6B365</b>	S (C)	R	S (C)	R	R	S (C)	R	S (C)
<b>Salamouni</b>	R	R	R	R	R	R	R	R

**S(N)** : Sensible avec développement de nécrose. **S(C)** : Sensible avec développement de chlorose. **R** : Résistant

Toutefois, comme le génotype Salamouni est résistant à tous les isolats de *P. tritici-repentis*, les réactions de trois génotypes (Glenlea, 6B662, 6B365), seules sont effectivement efficaces pour la classification de ces isolats. Ce système a été adopté par la plupart des équipes de recherches à travers le monde, et est aujourd'hui largement utilisé. Deux autres génotypes de blé dur ont été proposés pour être ajoutés à cette gamme ; il s'agit de la variété Coulter et la lignée 4B1149 (Lamari *et al.*, 2003 ; Benslimane *et al.*, 2011).

La classification est basée, ainsi sur la présence des différents effecteurs nécrotrophes (NE : necrotrophic effectors), connus comme toxines spécifiques à l'hôte (host selective toxins : HST), et produites par les isolats de *P. tritici-repentis* (Faris *et al.*, 2013). Celles-ci ont été décrites et désignées par : Ptr ToxA, Ptr ToxB et Ptr ToxC (Orolaza *et al.*, 1995 ; Ciuffetti *et al.*, 1998 ; Effertz *et al.*, 2002). Ces toxines sont en effet responsables de l'apparition des deux symptômes de nécrose et/ou de chlorose dans l'interaction blé/*P. tritici-repentis* (Ballance *et al.*, 1989 ; Orolaza *et al.*, 1995 ; Zhang *et al.*, 1997 ; Effertz *et al.*, 2002).

Cependant, la classification actuelle en race pourrait connaître une révision comme l'ont suggéré plusieurs auteurs, en raison de l'existence possible de nouvelles races et de nouvelles toxines non identifiées autres que les Ptr ToxA, Ptr ToxB et Ptr ToxC (Moffat *et al.*, 2014 ; Guo *et al.*, 2018). Il existe en effet des rapports préliminaires sur l'existence probable d'autres races (Ali *et al.*, 2002 ; Moreno *et al.*, 2008 ; Ali *et al.*, 2010 ; Benslimane *et al.*, 2011 ; Guo *et al.*, 2018).

Plusieurs études menées sur la variation physiologique des populations de *P. tritici-repentis* ont observé une grande diversité dans la structure en races de différents pays (Ali et Francl,

2002 ; Lamari *et al.*, 2003 ; Sarova *et al.*, 2005 ; Engle *et al.*, 2006 ; Moreno *et al.*, 2008 ; Lepoint *et al.*, 2010 ; Benslimane *et al.*, 2011 ; Gamba *et al.*, 2012 ; Aboukhaddour *et al.*, 2013 ; Mikhailova *et al.*, 2014 ; Abdullah *et al.*, 2017a, b ; Kamel *et al.*, 2019). La race 1 et la race 2 sont les races prédominantes dans le monde (Lamari *et al.*, 1998 ; Ali et Francl, 2003 ; Friesen *et al.*, 2005 ; Singh *et al.*, 2007 ; Leisova-Svobodova, 2010 ; Gamba *et al.*, 2012 ; Aboukhaddour *et al.*, 2013). Les Races 3 et 4 sont peu fréquentes (Lamari et Bernier, 1989c ; Ali et Francl, 2003 ; Engle *et al.*, 2006). La race 5 a été observée pour la première fois en Algérie (Lamari *et al.*, 1995) ; elle a également été observée aux Etats-Unis d'Amérique (Ali *et al.*, 1999) et au Canada (Strelkov *et al.*, 2002), en Syrie et en Azerbaïdjan (Lamari *et al.*, 2005b), puis récemment elle a été retrouvée en Tunisie et au Maroc (Gamba *et al.*, 2017 ; Kamel *et al.*, 2019). La race 6 n'a été rapportée jusqu'à aujourd'hui qu'en Afrique du nord (Strelkov *et al.*, 2002 ; Benslimane *et al.*, 2011 ; Gamba *et al.*, 2017 ; Kamel *et al.*, 2019). Les races 7 et 8 se sont avérées communes dans les régions du Caucase et du Croissant fertile (Lamari *et al.*, 2003), et en Afrique du Nord (Benslimane *et al.*, 2011 ; Gamba *et al.*, 2017 ; Kamel *et al.*, 2019).

En Afrique du Nord, la structure des populations pathogènes en races de *P. tritici-repentis* a été précédemment étudiée aussi bien en Algérie, en Tunisie et au Maroc (Benslimane *et al.*, 2011 ; Gamba *et al.*, 2017 ; Kamel *et al.*, 2019 ). En Algérie, où les races 5 et 6 avaient été les seules détectées lors d'une étude réalisée en 1993 (Lamari *et al.*, 1995), Benslimane *et al.* (2011) ont pu identifier 6 races présentes dans ce pays qui sont les races 1, 4, 5, 6, 7 et 8. Au Maroc, Gamba *et al.* (2017) ont pu identifier 4 races, 1, 5, 6 et 7 de ce champignon, avec une prévalence des deux races 5 et 6. Enfin en Tunisie, très récemment, les races 2, 4, 5, et 7 ont été retrouvées (Kamel *et al.*, 2019).

### **II.2.6. Toxines produites par *P. tritici-repentis***

Généralement, les toxines sont produites par des agents pathogènes nécrotrophes bactériens et fongiques (Alfano et Collmer, 1996). Elles sont habituellement divisées en deux groupes : i) les toxines non spécifiques de l'hôte (NHST = non host selective toxins) auxquelles de nombreuses espèces végétales sont sensibles ; ii) les toxines spécifiques de l'hôte (HST= host selective toxins), molécules qui ne sont toxiques que pour l'hôte (Friesen *et al.*, 2008). Ces dernières sont appelées aussi des effecteurs nécrotrophes (NE : necrotrophic effectors) (Kariyawasam *et al.*, 2016).

La sensibilité à ces toxines est limitée à des génotypes spécifiques de l'hôte (Friesen *et al.*, 2008). Les interactions entre ces toxines et leurs hôtes sont très spécialisées, et opposées à

l'interaction classique du gène pour gène où la sensibilité/susceptibilité est habituellement conférée par un seul gène dominant (Wolpert *et al.*, 2002).

Jusqu'à présent, au moins trois toxines spécifiques produites par *P. tritici-repentis* ont été décrites et désignées Ptr ToxA, Ptr ToxB et Ptr ToxC (Orolaza *et al.*, 1995 ; Ciuffetti *et al.*, 1998 ; Effertz *et al.*, 2002). Les symptômes de nécrose et/ou chlorose résultent de l'activité de ces trois toxines, elles sont produites de manière différente par les races de *P. tritici-repentis*, et sont des facteurs de pathogénicité (Orolaza *et al.*, 1995 ; Ciuffetti *et al.* 1997 ; Wolpert *et al.*, 2002 ; Friesen *et al.*, 2008 ; Ciuffetti *et al.*, 2010) ou de virulence (Friesen *et al.*, 2003). Ces 3 toxines sont responsables du bouleversement des mécanismes de résistance de l'hôte conduisant à des symptômes de maladie sur les cultivars de blé sensibles (Faris *et al.*, 2013).

Trois races (2, 3 et 5) produisent une seule toxine spécifique ; la race 2 produisant la Ptr ToxA, la race 3 produisant la Ptr ToxC et la race 5 produisant la Ptr ToxB (Ballance *et al.*, 1989 ; Orolaza *et al.*, 1995 ; Effertz *et al.*, 1998). Trois autres races (1, 6 et 7) produisent chacune deux toxines spécifiques ; la race 1 produisant la Ptr ToxA et la Ptr ToxC, la race 6 produisant la Ptr ToxB et la Ptr ToxC et la race 7 la Ptr ToxA et la Ptr ToxB (Lamari and Bernier 1989b ; Ballance *et al.*, 1989 ; Effertz *et al.*, 1998 ; Effertz *et al.*, 2002 ; Strelkov *et al.*, 2002). Les isolats de la race 8 produisent toutes les trois toxines spécifiques (la Ptr ToxA, la Ptr ToxB et la Ptr ToxC) (Lamari *et al.*, 2003). Tandis que les isolats qui appartiennent à la race 4 ne produisent pas de toxines connues, et sont considérés comme non pathogènes (Lamari et Bernier, 1989c).

### **II.2.6.1. La toxine Ptr ToxA**

C'est la première toxine identifiée, isolée et caractérisée (Ballance *et al.*, 1989 ; Tomas *et al.*, 1990 ; Tuori *et al.*, 1995 ; Zhang *et al.*, 1997). La Ptr ToxA est une protéine synthétisée par voie ribosomique, d'une masse de 13,2 kDa (Ballance *et al.*, 1989 ; Tomas *et al.*, 1990). Elle est présente chez environ 80 % des isolats de *P. tritici-repentis* collectés dans le monde (Friesen *et al.*, 2006 ; Oliver et Solomon, 2008). La Ptr ToxA est codé par un gène nommé ToxA (Ciuffetti *et al.*, 1997). Le clonage de ce gène a révélé qu'il code pour une proprotéine de 19,7 kDa, qui subit un traitement protéolytique pour donner la toxine mature (Ballance *et al.*, 1996 ; Ciuffetti *et al.*, 1997).

Le gène ToxA contient deux introns ; l'intron 1 (55 nucléotides) est situé dans la séquence leader 5', et l'Intron 2 (50 nucléotides) est situé dans la région qui code le domaine C-terminal (Ciuffetti *et al.*, 1997). Les deux introns sont petits, comme c'est typique des génomes fongiques (Gurr *et al.*, 1987). L'intron 1 possède des jonctions d'épissage typique ; 5' (-GT) et 3' (AG-), comme celles rencontrées chez les eucaryotes. Cependant l'intron 2, possédant les jonctions 5' (-

AT) et 3' (AC-), manque des deux séquences consensus (Ciuffetti *et al.*, 1997). Le gène ToxA semble être un gène à copie unique qui est absent chez les isolats non producteurs de la toxine (Ballance *et al.*, 1996 ; Ciuffetti *et al.*, 1997). Des gènes ToxA très similaires sont également présents chez l'espèce *Parastagonospora nodorum* (Friesen *et al.*, 2006 ; Stukenbrock et McDonald, 2007), et *Bipolaris sorokiniana* (McDonald *et al.*, 2017). La grande variation de ce gène chez *P. nodorum*, bien qu'il soit très conservé chez *P. tritici-repentis*, reste le principal support de l'hypothèse de son acquisition par ce dernier à partir de *P. nodorum* (Oliver et Solomon, 2008 ; McDonald *et al.*, 2017).

La sensibilité aux toxines suit un modèle, qui est l'inverse de celui du gène pour gène ; l'absence de nécrose (résistance) est le résultat de la non-reconnaissance, tandis que la présence de nécrose (sensibilité) est due à la reconnaissance de la toxine (Strelkov et Lamari, 2003). La sensibilité du blé à la toxine Ptr ToxA est conditionnée par un seul gène dominant localisé sur le chromosome 5BL (Faris *et al.*, 1996 ; Stock *et al.*, 1996), nommé *Tsn1* (Faris *et al.*, 2010).

Lors de l'exposition au produit du gène ToxA, les génotypes de blé qui possèdent le gène de sensibilité *Tsn1* expriment une nécrose (Faris *et al.*, 1996 ; Gamba *et al.*, 1998 ; Anderson *et al.*, 1999 ; Faris *et al.*, 2010). Durant cette interaction, la toxine Ptr ToxA se trouve localisée au niveau du cytoplasme et des chloroplastes, cette nécrose va entraîner une réduction de la photosynthèse, ce qui a un impact directe sur la production céréalière (Manning *et al.*, 2007). Inversement, chez les cultivars insensibles, la toxine est incapable de passer de l'espace apoplastique aux cellules mésophylliennes (Day *et al.*, 2015). Cependant, le fait de forcer l'entrée des toxines dans les cellules des feuilles, entraîne une toxicité à la fois pour les cultivars résistants et sensibles, donc l'intériorisation de ces toxines est nécessaire pour la sensibilité (Manning *et al.*, 2007). Quoique, l'interaction ToxA-*Tsn1* soit un aspect principal dans les programmes d'amélioration de la résistance à la maladie du Tan spot (See *et al.*, 2018). Faris *et al.* (2010) ont confirmé que le rôle du gène *Tsn1* lui-même, n'est pas la reconnaissance. Selon ces auteurs, il serait plutôt impliqué dans l'initiation de la signalisation moléculaire, permettant de faciliter l'importation de la toxine Ptr ToxA dans les cellules du mésophile.

Le transfert du gène ToxA de *P. tritici-repentis* dans des isolats avirulents, les rends virulents (Ciuffetti *et al.*, 1997). Toutefois, le rôle de ToxA dans l'apparition de la maladie n'est pas bien défini (See *et al.*, 2018). Il est possible que la relation entre ToxA et la sensibilité à la maladie ne dépend pas seulement de l'interaction ToxA-*Tsn1*, mais aussi l'interactions d'autres effecteurs et leurs gènes de sensibilité présents chez le blé (See *et al.*, 2018).

### II.2.6.2. La toxine Ptr ToxB

La toxine Ptr ToxB est la deuxième toxine isolée et caractérisée (Ciuffetti *et al.*, 2010). La Ptr ToxB est une petite protéine d'une masse de 6,6 kDa, qui induit une chlorose sur les génotypes de blé sensibles (Strelkov *et al.*, 1999 ; Martinez *et al.*, 2001). Elle est produite essentiellement par les races 5, 6, 7 et 8 (Orolaza *et al.*, 1995 ; Strelkov *et al.*, 1999 ; Lamari *et al.*, 2003). La Ptr ToxB est stable à la chaleur jusqu'à 55 °C (Orolaza *et al.*, 1995).

Peu d'information ont été fournies sur le mode d'action de la Ptr ToxB (Strelkov et Lamari, 2003), elle semble impliquer dans la photooxydation de la chlorophylle liée à la lumière, probablement par une inhibition directe ou indirecte de la photosynthèse (Kim *et al.*, 2010). Cette toxine induit également la dégradation de la chlorophylle dans les génotypes de blé sensibles, ce qui entraîne l'apparition du symptôme de chlorose (Pandelova *et al.*, 2012). Les études de localisation par fluorescence de la Ptr ToxB, suggèrent qu'elle reste dans l'apoplaste chez les génotypes de blé sensibles et insensibles, ce qui indique qu'elle pourrait agir comme un effecteur extracellulaire (Figuroa *et al.*, 2015). La capacité de production de la Ptr ToxB est une condition suffisante pour la pathogénicité chez *P. tritici-repentis*, ceci confirme le rôle de cette toxine dans la compatibilité entre le champignon et les différents génotypes du blé (Kim *et al.*, 2014). Ptr ToxB ne semble pas contrôler les fonctions biologiques vitales, mis à part son rôle dans la pathogénèse (Strelkov et Lamari, 2003).

La Ptr ToxB est codée par le gène ToxB, qui code une préprotéine de 87 acides aminés, à l'origine d'une protéine mature de 64 acides aminés après clivage du peptide signal (Martinez *et al.*, 2001 ; Figuroa-Betts *et al.*, 2011). Ce gène comprend un cadre de lecture ouvert (Open Reading Frame : ORF) de 261 pb (Martinez *et al.*, 2001 ; Strelkov, 2002). Contrairement au gène ToxA, ce gène présente des homologues retrouvées chez des races autres que celles connues pour produire la Ptr ToxB, comme le cas des races 3 et 4 (Faris *et al.*, 2013). Parmi ces derniers, *toxb* qui présente une similarité de 86 % au gène ToxB, son ORF code une préprotéine avec un peptide signal de 23 acides aminés ((Martinez *et al.*, 2004).

Une comparaison des séquences d'acides aminés des produits de ToxB actif et de *toxb* inactif, montre 13 acides aminés différents entre les deux protéines, et un acide aminé supplémentaire dans la région C-terminale du *toxb* (Figuroa-Betts *et al.*, 2011). *toxb*, a été cloné et comparé avec six *loci* de ToxB d'un isolat de la race 5. Les six copies avait toutes des ORF identiques et codaient donc la même forme de la Ptr ToxB (Martinez *et al.*, 2001). De même, la séquence désignée *toxb* de l'isolat de la race 4 SD20 (South Dakota, USA), partageait 86 % d'identité avec ToxB (Martinez *et al.*, 2004).

L'activité de la Ptr ToxB native, de la toxine modifiée, ainsi que du produit du gène *tox**b* modifié, a été comparée par leur infiltration au cultivar Katepwa reconnu pour sa sensibilité à l'égard de la Ptr ToxB (Figuroa Betts *et al.*, 2011). Ces derniers auteurs ont démontré que les deux premières protéines provoquaient l'apparition de chlorose de la même façon, alors que la troisième n'induisait aucun symptôme.

Par ailleurs selon Pandelova *et al.* (2012), l'apparition des symptômes est plus rapide en présence du gène ToxA, comparé à celle de ToxB. Ceci peut être expliqué par la différence lors de l'activation des processus spécifiques à l'expression de chaque gène (Pandelova *et al.*, 2012)

Enfin, il a été constaté que l'interaction spécifique du *P. tritici-repentis* avec l'orge, était médiée par la Ptr ToxB qui induit une chlorose (Aboukhaddour et Strelkov, 2016). Toutefois les symptômes induits sur l'orge étaient plus faibles que ceux sur le blé, et une concentration plus élevée de la toxine était nécessaire pour les induire (Aboukhaddour et Strelkov, 2016 ; See *et al.*, 2019). La spécificité entre le *P. tritici-repentis* et l'orge était évidente, puisque la chlorose se développait sur certains génotypes d'orge mais pas sur d'autres (Aboukhaddour et Strelkov, 2016).

### **II.2.6.3. La toxine Ptr ToxC**

La toxine Ptr ToxC cause également la chlorose, qui est généralisée, comme observée chez la lignée 6B-662 (Strelkov et Lamari, 2003), et non localisée comme dans le cas de la Ptr ToxB, observée chez la lignée 6B-365.

La Ptr ToxC a été partiellement purifiée (Effertz *et al.*, 2002). Son analyse a indiqué qu'elle n'est pas de nature protéique, mais semble plutôt être une molécule polarisée, non ionique, de bas poids moléculaire (Effertz *et al.*, 2002). Les données concernant la nature exacte de cette toxine restent encore non disponibles (Lamari et Strelkov, 2010) et le/les gène(s) responsable(s) de sa production n'est/ne sont pas encore cloné(s) (Faris *et al.*, 2013). Toutefois, les analyses génétiques ont montré qu'elle est un facteur de pathogénicité important associé au développement de la maladie de la tache auréolée (Lamari and Bernier, 1991 ; Faris *et al.*, 1997 ; Gamba *et al.*, 1998 ; Effertz *et al.*, 2002).

En plus de la race 1, la toxine Ptr ToxC est également produite par les races 3, 6 et 8 (Gamba *et al.*, 1998 ; Strelkov *et al.*, 2002 ; Effertz *et al.*, 2002 ; Lamari *et al.*, 2003). Récemment, une activité de la Ptr ToxC a été rapportée dans les sécrétions des spores en germination, chez un isolat de la race 3 de *P. tritici-repentis* (Tran *et al.*, 2017).

Il est très probable que *P. tritici-repentis* produise d'autres toxines en plus des trois décrites (Faris *et al.*, 2013). Des études ont suggéré l'existence d'autres toxines spécifiques à l'hôte (Andrie *et al.*, 2007 ; Ali *et al.*, 2010). De même, les travaux de Guo *et al.* (2018), ont montré

que le pathosystème *P. tritici-repentis*-blé n'était pas seulement basé sur les trois interactions de sensibilité connues, mais implique probablement des interactions supplémentaires.

Enfin, il est à rappeler que comme les toxines spécifiques à l'hôte sont le plus souvent reconnues par des gènes de sensibilité spécifiques dominants chez l'hôte pour provoquer la maladie, l'observation des résistances récessives est une autre indication que des interactions supplémentaires hôte-toxines spécifiques à l'hôte s'effectuent dans ce pathosystème (Faris *et al.*, 2013).

## **II.2.7. Variabilité du *P. tritici-repentis***

### **II.2.7.1. La variabilité physiologique ou pathogénique**

Des variations de virulence et/ou d'agressivité dans la population de *P. tritici-repentis* ont été souvent signalées. Ces résultats ont été obtenus à l'aide d'échelles d'évaluation quantitatives (nombre et taille des lésions et/ou surface foliaire nécrosée) et qualitatives (type de lésions de nécrose et/ou de chlorose) (Lamari et Bernier, 1989c ; Schilder et Bergstrom, 1990).

Par ailleurs et selon Lamari *et al.*, (2003), la capacité de chaque isolat de *P. tritici-repentis* à induire les symptômes de nécrose et de chlorose montre l'existence d'une variation physiologique de cet agent pathogène. L'induction de ces deux symptômes est le résultat d'interactions spécifiques entre des isolats de l'agent pathogène et des lignées/cultivars de blé sensibles (Lamari *et al.*, 2003).

Cette variabilité est le plus souvent évaluée depuis les années 90 de façon qualitative. En effet, Lamari et Bernier (1989b) ayant constaté que des isolats pouvaient induire des symptômes sur des génotypes de blé sensibles de manière différentielle ; ils ont regroupé les isolats en 4 pathotypes. Bien qu'utile, ce système de classification basé sur les symptômes ne pouvait distinguer que quatre types de virulence. Une limite qui a été mise en évidence par l'identification d'isolats Algériens qui ne pouvait provoquer que la chlorose, mais qui était différente de celle produite par le pathotype 3 (Lamari *et al.*, 1995).

Ainsi et afin de remédier à ce problème, Lamari *et al.* (1995) ont proposé un système de classification basé sur les races. Dans ce système, les isolats sont classés sur la base de leurs modèles de virulence sur un ensemble d'hôtes différentiels. Au total, huit races ont été identifiées à ce jour et numérotées de 1 à 8 (Lamari *et al.*, 2003) ; toutes les races sont virulentes sur au moins un des cultivars de la gamme différentielle à l'exception de la race 4, qui représente des isolats avirulents. Le site de la réaction des différentes races sur les hôtes, est médité par l'action de toxines spécifiques de l'hôte.



Depuis que le système de classification de race, basé sur le type de la lésion chez *P. tritici-repentis*, a été établi (Lamari *et al.*, 1995), plusieurs études ont été menées pour détecter la variation dans les populations de *P. tritici-repentis* (Lamari et Bernier, 1989b ; Ali et Francl, 2002 ; Lamari *et al.*, 2005b ; Friesen *et al.*, 2005 ; Sarova *et al.*, 2005 ; Engle *et al.*, 2006 ; Singh *et al.*, 2007 ; Benslimane *et al.*, 2011 ; Gamba *et al.*, 2012 ; Aboukhaddour *et al.*, 2013). Ces travaux ont rapportés la variabilité des populations quant à leurs compositions en races.

### **II.2.7.2. Variabilité génétique**

La variabilité des agents pathogènes des plantes est un problème majeur dans la lutte contre les maladies, et la connaissance de la variabilité génétique est essentielle pour mettre au point des pratiques de gestion durables, y compris le développement de génotypes résistants (Stakman, 1957), pour cela, l'utilisation d'outils moléculaires est utile et recommandée (Williams *et al.*, 1990).

Chez *P. tritici-repentis*, la variabilité génétique est importante et courante (De Wolf, 1998). Plusieurs travaux ont examiné la diversité génétique des isolats de différentes races. Ainsi, le nombre haploïde de chromosomes et la taille de ces derniers se sont avérés variables, aussi bien au sein des différentes races qu'entre celles-ci ; dans ce contexte 47 isolats de *P. tritici-repentis* ont été regroupés en 29 caryotypes différents (Aboukhaddour *et al.*, 2009).

Des études antérieures ont utilisé des marqueurs moléculaires pour évaluer la diversité des isolats de *P. tritici-repentis* provenant de divers endroits géographiques ; elles ont le plus souvent mis en évidence une grande variabilité moléculaire. Ces marqueurs ont compris l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD : Randomly Amplified Polymorphism DNA) (Dos Santos *et al.*, 2002 ; Singh et Hughes, 2006 ; Mironenko *et al.*, 2007), le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP : Amplified Fragment Length polymorphisme) (Leisova *et al.*, 2008 ; Benslimane *et al.*, 2013), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP : Restriction Fragments length polymorphism) (Faris *et al.*, 1997), et les interséquences simples répétés (ISSR : Inter-Simple Sequence Repeat) (Moreno *et al.*, 2008).

La plupart des analyses n'ont révélé aucune relation significative entre les polymorphismes de l'ADN et l'origine géographique ou la classification en race (Aboukhaddour *et al.*, 2009 ; Dos Santos *et al.*, 2002 ; Mironenko *et al.*, 2007 ; Singh et Hughes, 2006 ; Friesen *et al.*, 2005 ; Benslimane *et al.*, 2013). Ainsi, Leisova *et al.* (2008), lors d'une étude de la diversité d'une collection de 100 isolats de différentes origines (la République tchèque, la République slovaque, la Russie, le Canada, les États-Unis et l'Argentine) ont montré que la variabilité génétique était indépendante de la classification en race ou de l'origine géographique, à l'exception de la race 4.

Dans d'autres travaux réalisés par Aboukhadour *et al.* (2011) pour l'évaluation du niveau de la diversité génétique d'une collection de 80 isolats de différentes origines (le Canada, l'Azerbaïdjan, l'Algérie et la Syrie) par des marqueurs SSR (Simple Sequence Repeat), il a été possible de regrouper les isolats étudiés en 4 population distinctes selon leur origine géographique. Les mêmes auteurs ont observé une nette différenciation génétique entre les isolats non producteurs de Ptr ToxA (races 3, 4, 5 et 6) par rapport aux isolats producteurs de celle-ci (races 1, 2, 7 et 8), et ils ont conclu que les races 1 et 2 étaient plus étroitement liées aux races 7 et 8, mais plus éloignées des races 3 et 5.

### **II.3. La relation du gène pour gène dans l'interaction blé/*P. tritici-repentis***

Une interaction compatible entre les agents pathogènes nécrotrophes et le blé, implique la reconnaissance des toxines spécifiques à l'hôte par le produit d'un gène de sensibilité de l'hôte, qui finit par provoquer une réaction de sensibilité de la plante hôte (Faris *et al.*, 2013).

Lamari *et al.* (2003) ont proposé l'existence d'une relation « gène-pour-gène » dans l'interaction blé/*P. tritici-repentis*. Dans cette interaction, le produit du gène d'avirulence du pathogène est reconnu par le produit du gène de résistance de l'hôte (Ciuffetti *et al.*, 2014). Cette relation se présente comme une image renvoyée par un miroir du modèle classique de la relation « gène-pour-gène » qui a été mis en évidence grâce aux travaux de Flor (Flor, 1971).

Il est à rappeler qu'un niveau de complexité supplémentaire existe dans l'interaction « gène-pour-gène » dans le cas de la production des toxines spécifique à l'hôte (HST ou NE : effecteurs nécrotrophes), qui ont été principalement décrites chez des Dothideomycètes nécrotrophes (Friesen *et al.*, 2008).

Comme tous les autres champignons nécrotrophes, *P. tritici-repentis* agit par la production d'effecteurs nécrotrophes (NE), (Kariyawasam *et al.*, 2016). Dans ce cas, le succès de l'infection (réaction de compatibilité) est conditionné par une interaction entre une toxine produite par le pathogène (produit d'un gène) et un gène (récepteur) de sensibilité présent chez la plante hôte ; cette relation spécifique est qualifiée de « gène-pour-gène inversé » (Friesen *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2019). Elle correspond à la réaction d'incompatibilité dans le modèle de Flor (1956) (Singh *et al.*, 2010 ; Faris *et al.*, 2013) (Fig. 7). Par conséquent, la résistance dans le pathosystème blé/*P. tritici-repentis* résulte de l'absence d'un gène de sensibilité plutôt que de la présence d'un gène de résistance (Singh *et al.*, 2010). A titre d'exemple, afin de permettre la colonisation de l'hôte, la toxine Ptr ToxA, produite par le champignon, interagit avec une protéine de sensibilité chez le blé, produit du gène *Tsn1* (Faris *et al.*, 2010). En revanche, si l'agent pathogène ne produit pas d'effecteurs, ou si l'hôte ne possède pas le gène de sensibilité correspondant, une interaction

incompatible se produit et entraîne à une résistance (Faris *et al.*, 2010).

Par conséquent, la résistance dans le cas des champignons nécrotrophes est généralement récessive et due à l'absence de reconnaissance des effecteurs par l'hôte (Kariyawasam *et al.*, 2016). Trois interactions ont été identifiées dans le pathosystème blé/*P. tritici-repentis*, Ptr ToxA/*Tsn1*, Ptr ToxB/*Tsc2* et Ptr ToxC/*Tsc1* (Ciuffetti *et al.*, 2010 ; Faris *et al.*, 2013), dont l'interaction Ptr ToxA-*Tsn1* conduit à la nécrose, tandis que les deux autres, Ptr ToxB/*Tsc2* et Ptr ToxC/*Tsc1*, conduisent à la chlorose (Kariyawasam *et al.*, 2016).

#### **II.4. Les moyens de lutte contre *P. tritici repentis***

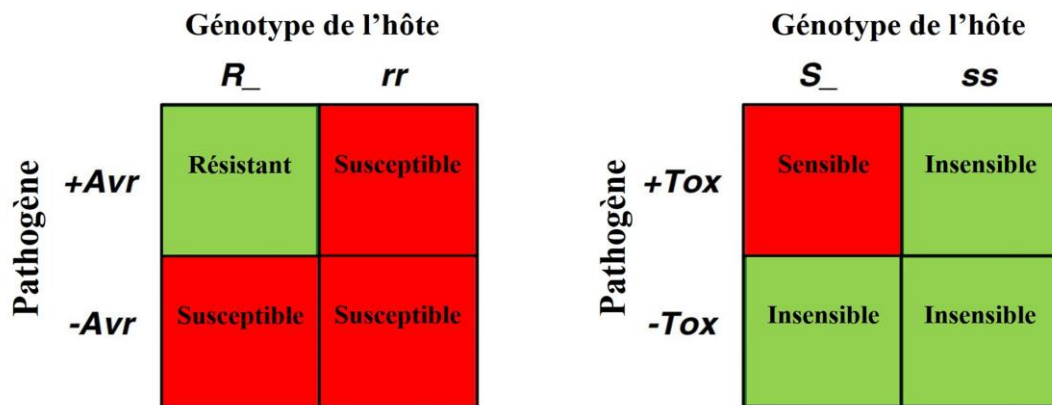
De nombreuses méthodes de lutte sont disponibles pour la gestion de la tache auréolée du blé, toutefois, une seule méthode assure rarement une protection totale. Afin de réduire le risque d'épidémies de la tache auréolée et l'utilisation de pesticides, il est important d'adopter une gestion intégrée adéquate, qui combine les moyens de contrôles cultureux, chimiques, biologiques et génétiques (Perello *et al.*, 2003, 2008 ; Simon *et al.*, 2011).

##### **II.4.1. La lutte culturale**

Elle est basée sur l'application des pratiques culturales adéquates ; plusieurs travaux ont démontré en effet que la perte de rendement causée par les maladies des taches foliaires peut varier considérablement en fonction des pratiques culturales.

Des pratiques culturales telles qu'un travail du sol de conservation, des rotations de cultures courtes, une culture continue du blé et surtout, la culture de cultivars très sensibles, peuvent augmenter l'incidence de la maladie (Ciuffetti *et al.*, 1999).

L'élimination ou la diminution de l'inoculum primaire est une stratégie importante dans la lutte contre la maladie du Tan spot (Mc Mullen, 2003) ; la destruction des chaumes et des résidus de cultures infectées par l'enfouissement, contribue à cette action (McMullen, 2003 ; Moffat et Santana, 2018). Les épidémies de la tache auréolée ont été en effet associées à la paille de blé infectée qui est considérée comme la principale source d'inoculum (Sutton et Vyn, 1990). De même qu'aux cycles répétés de production de conidies sur les tissus foliaires malades (Schilder et Bergstrom, 1992).



Modèle classique du gène pour gène (Flor).

Interaction entre un effecteur d'un pathogène biotrophe (*Avr*) et le gène de résistance de l'hôte (*R*).

Modèle inversé du gène pour gène (toxines spécifiques à l'hôte).

Interaction entre le gène de sensibilité de l'hôte (*S*) et la toxine du pathogène nécrotrophe (*Tox*) (cas blé-*P. tritici-repentis*).

**Figure 7 :** Comparaison des interactions génétiques qui se produisent dans le modèle classique du « gène-pour-gène » et le modèle « inverse du gène-pour-gène » impliquent les toxines spécifiques à l'hôte (Faris *et al.*, 2013).

Par ailleurs, il est également très recommandé de pratiquer des rotations culturales (Duveiller *et al.*, 2007), ou de changer complètement le champ, par un autre présentant un risque moindre de maladie (Moffat et Santana, 2018). Le blé ne doit pas être cultivé plus d'une année sur trois sur la même parcelle, cette dernière doit être occupée entre temps par une culture non hôte du *P. tritici-repentis* (Summerell et Burgess, 1989).

L'emplacement du champ, la topographie et la direction du vent dominant, doivent également être pris en considération, car l'ensemencement sous le vent d'un champ ayant des antécédents de tache auréolée, peut présenter un risque élevé de maladie ; les conidies peuvent en effet parcourir jusqu'à 200 km (De Wolf *et al.*, 1998). Le travail réduit du sol est à éviter, car il a été démontré qu'il était à l'origine de l'augmentation de la gravité de la tache auréolée (Bankina *et al.*, 2018).

Il est recommandé également d'éviter les semis produisant une densité de végétation excessive (Hershman et Vincelli, 1997). De même que, le maintien d'une semence de qualité, exempte de pathogènes, avec une bonne germination et une bonne vigueur, est également un élément important d'un programme holistique de gestion des maladies (Moffat et Santana, 2018).

La fertilisation azotée, sous sa forme ammoniacale, semble réduire le développement des lésions provoquées par le Tan Spot (Krupinsky et Tanaka, 2001). La fertilisation potassée (Sharma *et al.*, 2005), et l'application foliaire de micronutriments (Bore, Manganèse et Zinc), ont également montré leur efficacité dans la réduction de la sévérité de la maladie.

#### **II.4.2. La lutte chimique**

L'application d'un fongicide foliaire a permis d'augmenter considérablement le rendement du blé (Bhatta *et al.*, 2018). En outre, le traitement des semences peut s'avérer comme un moyen utile dans le cadre d'une lutte intégrée (Duveiller, 2004). Ainsi, Evans *et al.* (1999) ont constaté qu'en Oklahoma, la tache auréolée réduisait les rendements de 15 % dans les parcelles inoculées, par rapport aux parcelles traitées avec le fongicide. Au Mexique ; Villareal *et al.* (1995) ont constaté que le rendement était inférieur de 43 % dans les parcelles non traitées par rapport à celles traitées avec un fongicide.

Cette application est rentable lorsque les géotypes sensibles sont plantés dans des conditions environnementales favorables au développement de la maladie (Wegulo *et al.*, 2011). Wegulo *et al.* (2009) ont indiqué que l'application de fongicides a permis d'éviter des pertes de rendement pouvant atteindre 42 %, causées essentiellement par la tache auréolée et la tache helminthosporienne (spot blotch) sur le blé d'hiver.

Les travaux de Bhatta *et al.* (2018) ont montré que l'application d'un fongicide foliaire, (Prosaro 421 SC [Bayer Crop Science, Leverkusen, Allemagne] : prothioconazole + tébuconazole), a augmenté le rendement en grains, la teneur en protéines des grains, le poids des graines, le poids volumétrique du grains, la vigueur des feuilles et la surface des feuilles jusqu'à 42 %, 1 %, 16 %, 6 %, 48 % et 35 %, respectivement.

Pour garantir l'efficacité d'un fongicide, l'application doit être réalisée avant l'apparition des symptômes de la maladie. L'optimisation des méthodes appliquées selon les conditions locales de l'utilisateur sont indispensables ; celui-ci devant tenir compte des variétés cultivées, des fongicides utilisés, et des conditions environnementales qui peuvent affecter l'efficacité du traitement (Bockus, 1998).

Enfin, le rapport coût/bénéfice doit être pris en compte lors de l'application du fongicide, car des prix du blé bas et/ou des coûts d'application élevés, peuvent annuler tout bénéfice du résultat du traitement fongicide, même lorsque les niveaux de maladie sont élevés (Wiik et Rosenqvist, 2010 ; Wegulo *et al.*, 2011).

### **II.4.3. La lutte biologique**

La lutte biologique est la lutte qui implique l'utilisation de microorganismes antagonistes (Bockus, 1998), elle a été étudiée ces dernières années pour minimiser l'utilisation de produits chimiques (Perello et Dal Bello 2011).

Plusieurs champignons et bactéries ont été décrits comme possédant cette propriété d'antagonisme à l'égard de ce pathogène. Ainsi, *Trichoderma harzianum*, *T. aureoviride* et *T. koningii* inhibent la croissance de *P. tritici-repentis in vitro*, et réduisent significativement la sévérité de la maladie *in vivo* (Perello *et al.*, 2003).

Les travaux de Larran *et al.* (2016) ont montré que *T. hamatum*, *Penicillium sp.*, *Bacillus sp.* et *Paecilomyces lilacinus*, ont réduit de manière significative le diamètre de la colonie de l'agent pathogène. Par ailleurs, *Bacillus sp.* et *Fusarium sp.* ont réduit de manière significative le pourcentage de germination des spores de *P. tritici-repentis* de 82 % et 52 % respectivement.

### **II.4.4. La lutte génétique**

La méthode la plus économique et la plus sûre pour l'environnement, est l'utilisation de la résistance génétique durable (Ciuffetti et Tuori, 1999 ; Shankar *et al.*, 2017 ; Bhatta *et al.*, 2018 ; Liu *et al.*, 2019), elle constitue une meilleure solution à long terme (Moffat et Santana, 2018).

Le premier objectif pour l'élaboration d'une stratégie de sélection réussie et du développement de variétés résistantes à la tache auréolée devrait être selon Ciuffetti et Tuori (1999) et Faris *et al.* (2013), i) l'identification du nombre de *loci* conditionnant la résistance, l'identification de leurs relations de dominance, ainsi que celle des liens existant entre ces *loci* et ii) l'élimination des gènes de sensibilité aux toxines spécifiques.

De nombreuses sources de résistance ont été identifiées, et considérées comme utiles pour la poursuite de la découverte de nouveaux gènes de résistance, et pour leur incorporation dans les programmes de sélection du blé (Siedler *et al.*, 1994 ; Chu *et al.*, 2008a, b ; Oliver *et al.*, 2008 ; Friesen *et al.*, 2008 ; Sillero et Rubiales, 2012). Des génotypes ayant une bonne résistance à *P. tritici-repentis* ont été trouvés dans tous les niveaux de ploïdie du blé (Singh et Hughes, 2006).

Une réduction de 50 à 75 % de la gravité de la tache auréolée a été signalée en utilisant des cultivars modérément résistants (Singh *et al.*, 2008a). Dans certaines régions, l'utilisation de plusieurs lignées, et d'un mélange de cultivars, a également été utilisée pour lutter contre la tache auréolée (Cox *et al.*, 2004). Sillero et Rubiales (2012), ont évalué 22 lignées de *Tritordeum* (croisement entre *Hordeum chilense* et *Triticum sp.*) ainsi que leurs parents à l'égard de trois

rares différentes de *P. tritici-repentis* ; tous les *H. chilense* étudiés étaient résistants, alors que la réponse des blés, variait entre la sensibilité et la résistance élevée.

La transgénique et la modification du génome sont d'autres technologies disponibles pour le contrôle génétique des maladies du blé (Singh *et al.*, 2016).

## **II.5. Transfert horizontal du gène ToxA chez *P. tritici-repentis*, une cause de l'émergence de nouvelles maladies**

Le transfert horizontal des gènes, est un phénomène de transfert non mendélienne de l'ADN entre les organismes (Keeling et Palmer, 2008). Actuellement, de nombreuses études ont montré que le transfert horizontal entre les organismes eucaryotes, joue un rôle très important dans l'adaptation, en particulier dans le cas des microbes qui colonisent un hôte commun (Wisecaver *et al.*, 2014). L'examen du mécanisme possible de transfert met l'accent sur le rôle des transposons. La mobilisation de l'ADN d'un organisme donneur est beaucoup plus plausible si le gène est associé à un élément transposable (Oliver et Solomon, 2008 ; Moolhuijzen *et al.*, 2018). Dans ces cas, la tendance est à l'intégration des transposons au niveau de l'ADN répété (Larrondo *et al.*, 2007).

L'exemple typique de ce phénomène de transfert horizontal, est le gène de virulence ToxA qui a été signalé jusqu'à présent chez trois agents pathogènes du blé : *Parastagonospora nodorum*, *P. tritici-repentis*, et *Bipolaris sorokiniana* (Sarma *et al.*, 2005 ; Stukenbrock et McDonald 2007 ; Friesen *et al.*, 2006 ; McDonald *et al.*, 2017). Ces trois espèces appartiennent au même ordre « les Pleosporales », mais elles sont éloignées par plusieurs millions d'années, séparant leur spéciation (Grandaubert *et al.*, 2014).

Des études ont permis de mieux comprendre l'histoire évolutive potentielle du gène ToxA. Au départ, le gène ToxA n'était présent que chez les deux agents *P. tritici-repentis* et *P. nodorum*, cette affirmation est basée sur la présence d'une région homologue de 11 kb au niveau de ToxA qui aurait été transférée horizontalement de *P. nodorum* à *P. tritici-repentis* (Friesen *et al.*, 2006). La région homologue a ensuite été redéfinie comme une région beaucoup plus grande de 300 kb dans le génome de *P. nodorum* (Syme *et al.*, 2013).

La preuve que le gène ToxA a été transféré horizontalement à partir de *P. nodorum*, a été basée sur une évidence au niveau phylogénique, et au niveau de la population. Ces analyses révèlent en premier que, le gène était présent dans une séquence du génome *P. nodorum*, mais absent de tous les autres génomes séquencés et répertoriés dans les bases de données actuelles (Oliver et Solomon, 2008). Deuxièmement, le gène n'est pas présent dans tous les isolats de *P.*

*tritici-repentis*, ce qui correspond à une acquisition récente (Oliver et Solomon, 2008). Troisièmement, le schéma de variation de séquences très élevé du ToxA chez *P. nodorum* et très faible chez *P. tritici-repentis*, correspond aussi à une acquisition récente (Stukenbrock et McDonald 2007). En effet une étude portant sur 600 isolats de *P. nodorum* a révélé un très haut niveau de polymorphisme de séquences dans ce gène, par contre, un seul haplotype a été trouvé dans 57 isolats de *P. tritici-repentis*. Ceci correspond à une acquisition récente du gène, et suggère que *P. tritici-repentis* est le receveur et *P. nodorum* est le donneur (Friesen *et al.*, 2008). Les variations dans les séquences des isolats de *P. nodorum* est également cohérent avec l'acquisition de ToxA par cet organisme en Afrique du Sud, probablement lorsque le blé a été importé pour la première fois par les colonisateurs européens (Stukenbrock et McDonald, 2007 ; Friesen *et al.*, 2008). Enfin, le gène a été associé à un élément transposable (Oliver et Solomon, 2008).

Des épidémies des deux agents pathogènes se produisent chaque année, et les infections mixtes sur une même feuille sont courantes, il est donc probable que les deux champignons entrent régulièrement en contact étroit (Friesen *et al.*, 2006). Il est possible que des tubes d'anastomose conidiaux (CAT) se forment entre ces espèces, facilitant ainsi l'échange génétique (Roca *et al.*, 2005).

Toutefois il est à signaler que Friesen *et al.* (2006) et Oliver et Solomon (2008) ont supposé que le gène ToxA a été transféré à partir d'une troisième espèce non encore découverte, sans être en mesure d'identifier d'autres donneurs possibles. McDonald *et al.* (2013) ont montré qu'une troisième espèce de champignon, *Parastagonospora avenaria tritici*, contenait le gène ToxA et ont suggéré qu'il est le résultat probable d'une hybridation interspécifique. De même, un homologue de ce gène a été identifié chez le pathogène du maïs *Cochliobolus heterostrophus* (Lu *et al.*, 2015). Plus récemment, McDonald *et al.* (2017) ont signalé que *B. sorokiniana*, pathogène de l'orge et du blé, possédait une région de 12 kb homologue au locus ToxA, qui est presque identique à la région de 11 kb commune chez *P. tritici-repentis* et *P. nodorum*. La présence du gène chez cette espèce a aussi été rapportée par Friesen *et al.* (2018).

Pour définir le lieu et l'étendue de chaque événement de transfert horizontal, McDonald *et al.*, (2019), ont réalisé un séquençage d'ADN via de grandes lectures (séquençage de 3<sup>ème</sup> génération). Cela a permis de générer des assemblages de génomes presque complets pour plusieurs représentants de deux des trois espèces, en plus de plusieurs autres assemblages disponibles (Richards *et al.*, 2018 ; Moolhuijzen *et al.*, 2018). Ces assemblages expliquent le contexte génomique dans lequel le gène de virulence est situé, et fournissent des indications sur



les mécanismes potentiels du transfert horizontal des gènes, ainsi que l'historique de leurs événements (McDonald *et al.*, 2019). Les auteurs donnent la première description du ToxA avec des fonctionnalités de transposon complètes, qu'ils ont appelé ToxhAT. Chez les trois espèces, ToxhAT réside dans une grande région génomique (140 à 250 kb) riche en transposons, qui est absente des isolats qui ne portent pas le gène. Les mêmes auteurs ont démontré également que ToxhAT a été transféré entre *P. tritici-repentis* et *P. nodorum* sous forme de fragment, inclu dans une grande région d'environ 80 kb qui subit actuellement une désintégration extensive.

La toxine produite par le gène ToxA (Ptr ToxA) n'interagit apparemment qu'avec les lignées de blé exprimant le gène *Tsn1*. L'interaction ToxA/*Tsn1* est fortement associée à la maladie de la tache auréolée (See *et al.*, 2018). La possibilité d'introduction par inattention de ces lignées, a pu contribuer à l'explosion de la tache auréolée depuis les années 50 (Lamari *et al.*, 2005a). Cependant, des lignées de blé sensibles ont été largement plantées depuis la fin du XIXe siècle, bien avant l'émergence de la maladie. L'apparition de la tache auréolée dans les années 60 et 70, a coïncidé avec la plantation du blé exprimant le gène *Tsn1*, mais elle ne peut être une relation de cause à effet (Oliver et Solomon, 2008).

## **II.6. Mécanismes héréditaires de l'interaction blé/*P. tritici-repentis***

La résistance du blé à la tache auréolée est caractérisée par de petites lésions brun foncé qui n'augmentent pas en taille (Singh et Hughes, 2005), elle a été qualifiée comme étant qualitative (Duguid and Brûlé-Babel, 2001) ou quantitative (Faris *et al.*, 1997 ; Friesen et Faris 2004).

De nombreux chercheurs ont rapporté que la résistance du blé à la nécrose due à la maladie de la tache auréolée, est contrôlée par un seul gène récessif (Ciuffetti *et al.*, 1997 ; Anderson *et al.*, 1999 ; Singh *et al.*, 2006), tandis que la résistance à la chlorose est contrôlée par un seul gène dominant (Lamari et Bernier, 1991).

L'interaction blé/*P. tritici-repentis* suit largement le modèle inverse du « gène-pour-gène », bien que d'autres mécanismes d'interactions hôte-pathogène, y compris plusieurs QTL à large spectre et des gènes de résistance récessifs, soient également connus (Singh *et al.*, 2016). La compréhension de cette interaction et l'identification des QTL pour la résistance à la tache auréolée, peuvent faciliter le développement de cultivars résistants via des approches de sélection assistée par marqueurs moléculaires (Liu *et al.*, 2019).

Des gènes tels que *tsn1*, *tsn2*, *tsn3*, *tsn4*, *tsn5*, *tsn6*, *tsn-syn1* et *Tsn-syn2* sont connus pour affecter la sensibilité aux toxines et conférer une résistance spécifique à la nécrose (Anderson *et*

*al.*, 1999 ; Tadesse *et al.*, 2006a, b), tandis que les gènes récessifs *tsc1* et *tsc2* confèrent une résistance à la chlorose (Effertz *et al.*, 2002 ; Friesen et Faris, 2004 ; Abeysekara *et al.*, 2010).

Au cours des 20 dernières années, il a été démontré que la résistance génétique à la tache auréolée est un complexe, qui implique l'absence de gènes de sensibilité de l'hôte, de gènes de résistance récessive majeurs, de QTL non spécifique à la race, et d'autres QTL de résistance autres que les trois gènes de sensibilité (Kariyawasam *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2017).

### **II.6.1. Les gènes responsables de la sensibilité du blé au *P. tritici-repentis***

*P. tritici-repentis* produit trois toxines spécifiques à l'hôte décrites et désignées par Ptr ToxA, Ptr ToxB et Ptr ToxC (Orolaza *et al.*, 1995 ; Ciuffetti *et al.*, 1998 ; Effertz *et al.*, 2002). Ces trois toxines interagissent avec les produits des gènes dominants *Tsn1*, *Tsc2* et *Tsc1*, respectivement (Cotuna *et al.*, 2015), produisant les 3 interactions connues Ptr ToxA/*Tsn1*, Ptr ToxB/*Tsc2* et Ptr ToxC/*Tsc1* qui sont à l'origine de nécrose et/ou des chloroses (Lamari *et al.*, 1995 ; Strelkov *et al.*, 2002 ; Lamari *et al.*, 2005b). Des études évaluant l'action des gènes dans des populations spécifiques ont révélé aussi plusieurs gènes récessifs de résistance aux taches brunes (Singh *et al.*, 2006, 2008b ; Tadesse *et al.*, 2006a, b, 2008).

Par rapport à l'interaction Ptr ToxA/*Tsn1* qui entraîne une nécrose rapide, les interactions Ptr ToxB/*Tsc2* et Ptr ToxC/*Tsc1* entraînent toutes les deux des réponses chlorotiques plus lentes chez les lignées de blé sensibles (Corsi *et al.*, 2020). Cependant, plusieurs sources, suggèrent que le pathosystème et la sensibilité aux toxines, ne reposent pas uniquement sur ces trois interactions ; l'implication de l'interaction Ptr ToxA/*Tsn1* dans le développement de la maladie dépendrait du matériel génétique de l'hôte (Faris et Friesen, 2005 ; Chu *et al.*, 2008b ; Kariyawasam *et al.*, 2016). D'autres travaux ont montré également l'existence d'autres gènes de sensibilité à la tache auréolée chez le blé dur autres que ces 3 (Singh *et al.*, 2008c ; Guo *et al.*, 2018).

#### **II.6.1.1. Le gène *Tsn1***

Chez le blé, le locus *Tsn1* confère une sensibilité à la Ptr ToxA à la fois chez *P. tritici-repentis* que *P. nodorum* (Corsi *et al.*, 2020). Les isolats de *P. tritici-repentis* dépourvus de ToxA donnent une lésion indistincte sur les génotypes de blé contenant *Tsn1*, et les génotypes de blé dépourvus de *Tsn1* sont nettement moins sensibles aux races les plus courantes de l'agent pathogène (Friesen *et al.*, 2006). *Tsn1* code une protéine prédite contenant des domaines NBS-LRR (un domaine NB de liaison de nucléotides et un domaine LRR de répétition riche en

leucine), associés à un domaine de type S/TPK (sérine/thréonine protéine kinase) (Faris *et al.*, 2010).

*Tsn1* et *tsn1* sont deux symboles proposés pour désigner respectivement les allèles dominants et récessifs, qui confèrent la sensibilité aux isolats de *P. tritici-repentis* induisant la nécrose, localisés sur le chromosome 5B du blé (Faris *et al.*, 1996 ; Stock *et al.*, 1996).

Les variétés de blé insensibles à la Ptr ToxA présentent principalement une délétion complète de *Tsn1* (Corsi *et al.*, 2020). Toutefois, alors que *Tsn1* est nécessaire pour la reconnaissance de la Ptr ToxA, plusieurs études ont fait état de différentes protéines qui rentrent en interaction chez l'hôte (Corsi *et al.*, 2020). Les premiers travaux ont montré que la Ptr ToxA interagit avec la plastocyanine (Tai *et al.*, 2007) et la protéine ToxABP1 du chloroplaste (Manning *et al.*, 2007), qui peuvent toutes les deux favoriser l'induction d'un stress oxydatif, induisant la production d'espèces oxygénées réactives (ROS = reactive oxygen species), entraînant la mort cellulaire. Plus récemment, il a été démontré que la Ptr ToxA interagit de manière très spécifique avec la protéine PR-1-5, liée à la pathogénicité chez le blé (Lu *et al.*, 2014). Elle semble jouer un rôle dans la promotion de la nécrose dans les blés contenant le gène *Tsn1* (Corsi *et al.*, 2020).

Ainsi, deux marqueurs, *Xfcp393* et *Xfcp394*, ont été utilisés et recommandés pour le diagnostic de la résistance à la Ptr ToxA (Zhang *et al.*, 2009). Récemment, le marqueur *Xfcp623* a été proposé pour le diagnostic (Karelov *et al.*, 2015).

Toutefois, Faris et Friesen (2005), ont identifié un QTL au niveau des chromosomes 1B et 3B conduisant à une résistance à plusieurs races, diminuant ainsi les effets du gène *Tsn1*. Dans une autre étude, Chu *et al.* (2010), évaluant une population haploïde doublée de blé dur sensible à Ptr ToxA ont trouvé que l'interaction Ptr ToxA/*Tsn1* n'était pas importante dans le développement de la maladie. Ces résultats ont été confirmés par les travaux de Faris *et al.* (2020). De même, Kariyawasam *et al.* (2016) ont identifié un QTL à effet majeur, situé sur le chromosome 3BL qui avait un effet inhibiteur sur l'interaction Ptr ToxA-*Tsn1*.

### **II.6.1.2. Le gène *Tsc2***

La sensibilité à la chlorose induite par la Ptr ToxB est contrôlée par un seul gène dominant chez l'hôte (Orolaza *et al.*, 1995), situé sur le chromosome 2B et désigné par l'appellation *Tsc2* (Friesen et Faris, 2004 ; Abeysekara *et al.*, 2010). Friesen et Faris (2004) ont montré que l'interaction Ptr ToxB-*Tsc2* représentait 69 % de la variation de la maladie causée par la race 5. Les travaux de Faris *et al.* (1997) et Abeysekara *et al.* (2010) ont montré que le gène régissant la

sensibilité au Ptr ToxB, *Tsc2*, était probablement le même pour le blé tétraploïde et le blé hexaploïde (Faris *et al.*, 2013).

Plus récemment, l'analyse d'un QTL responsable de la sensibilité à la Ptr ToxB et des isolats de la race 5 a démontré que la sensibilité conférée par le gène *Tsc2* joue un rôle important dans la sensibilité à la tache auréolée dans le blé dur (Viridi *et al.*, 2016).

Jusqu'à présent, le gène *Tsc2* n'a pas été cloné et la structure du gène reste inconnue (Kariyawasam *et al.*, 2018).

### **II.6.1.3. Le gène *Tsc1***

Effertz *et al.* (2002) ont montré que l'insensibilité à la Ptr ToxC, qui coïncide avec la sensibilité à la chlorose induite par de la race 3, était régi par un seul gène. Il est situé sur le chromosome 1A et désigné par *Tsc1*.

Dans des travaux antérieurs, la résistance à la chlorose causée par les races 1 et 3 (qui produisent toutes les deux la Ptr ToxC) a été signalée comme contrôlée par un gène dominant dans certains croisements, et comme partielement dominant dans d'autres (Lamari et Bernier, 1991). Ce qui rejoint les conclusions, des études menées par Singh et Hughes (2006), qui ont suggéré que la résistance à la chlorose induite par la race 1 était dominante. Il a été cependant aussi rapporté que la résistance à la chlorose induite par la race 3 était conférée par un gène récessif (Gamba *et al.*, 1998). Alors que Duguid et Brule-Babel (2001) ont indiqué que l'hérédité de la résistance à la chlorose induite par les isolats de la race 3, pouvait aller de récessif, à partiellement dominant, voir complètement dominant, selon la composition génétique des lignées de blé utilisées. Ces résultats contradictoires sont probablement dus au fait que l'expression de la chlorose induite par les races 1 et 3 est de nature continue, et influencée par les conditions environnementales (Strelkov *et al.*, 2002).

Par la suite, des QTLs associés au locus *Tsc1* responsables de la sensibilité à la Ptr ToxC, ont également été identifiés (Kariyawasam *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2017).

Enfin il est à rappeler que, Liu *et al.* (2017) ont indiqué que le Ptr ToxC-*Tsc1* peut agir de manière additive avec le Ptr ToxA-*Tsn1* dans certains génotypes de blé. Jusqu'à présent, le gène *Tsc1* n'est pas non plus cloné malgré son importance dans la maladie (Kariyawasam *et al.*, 2018).

### **II.6.2. La résistance qualitative (monogénique)**

Auparavant, les gènes responsables de la résistance qualitative n'étaient associés qu'à la réponse aux filtrats de culture contenant des HST, et les désignations "*Tsc*" et "*Tsn*" indiquent les

HST responsables de la chlorose et de la nécrose respectivement ('*tan spot chlorosis*' et '*tan spot necrosis*' HSTs) (Faris *et al.*, 2013). L'identification ultérieure d'autres gènes a conduit à la désignation de plusieurs gènes comme *Tsn2*, *Tsn5* (Singh *et al.*, 2006 ; Tadesse *et al.*, 2006a, b), même si ces gènes n'étaient pas nécessairement associés avec la nécrose causée par une HST. C'est pourquoi, en 2007, il a été décidé que les gènes conférant la résistance qualitative porteraient la désignation "*Tsr*" pour *tan spot resistance* (résistance à la tache auréolée) (McIntosh *et al.*, 2008). Les gènes portant la désignation "*Tsr*" sont différents des gènes "*Tsn*" (McIntosh *et al.*, 2013).

Dans le système de désignation "*Tsr*", le gène récessif *tsr1* confère une résistance aux races 1 et 2 (Lamari et Bernier, 1989a, 1991 ; Gamba *et al.*, 1998 ; Singh *et al.*, 2008b), il est localisé sur le chromosome 5BL (Faris *et al.*, 1996 ; Anderson *et al.*, 1999). Les deux gènes *tsr2* et *tsr5* qui confèrent une résistance à la nécrose causée par les races 3 et 5 respectivement, sont récessifs et sont situés sur les chromosomes 3BL (Singh *et al.*, 2006 ; Singh *et al.*, 2008b). Deux autres gènes *tsr3* et *tsr4* qui confèrent une résistance à la race 1, sont aussi récessifs et sont situés sur les chromosomes 3DS et 3AS respectivement (Tadesse *et al.*, 2006a, b).

D'autres gènes contrôlant la résistance ont été rapportés, le gène *tsr6* responsable de la résistance à la chlorose provoquée par les isolats de la race 5, situé sur le chromosome 2BS (Singh *et al.*, 2008b). Le gène *Tsr7*, se trouve dans une région proximale du 3BL, il confère des niveaux élevés de résistance non spécifique de manière dominante (Faris *et al.*, 2020).

Les gènes *Tsr2*, *Tsr3*, *Tsr4* et *Tsr5* sont des synonymes de *Tsn2*, *Tsn3*, *Tsn4* et *Tsn5* respectivement, alors que *Tsc2* est synonyme de *Tsr6*. *Tsc1* n'a pas encore de synonyme dans la désignation *Tsr* en raison de son hérédité inconnue (Faris *et al.*, 2013).

### **II.6.3. La résistance quantitative**

Des études ont suggéré que l'interaction blé-*P. tritici-repentis* semble être plus complexe que le modèle inverse du « gène-pour-gène », et elle a été décrite comme polygénique (Lee et Gough, 1984 ; Ciuffetti *et al.*, 1999). Ainsi, de nombreux *loci* de caractères quantitatifs (QTL) ont été associés à la réaction à la tache auréolée (Kariyawasam *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2017 ; Guo *et al.*, 2018 ; Faris *et al.*, 2020).

Plusieurs QTL, conférant une résistance spécifique ou non spécifique à la race, ont été identifiés sur presque tous les chromosomes chez le blé (Patel *et al.*, 2013 ; Kariyawasam *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2017). Faris *et al.* (1997) ont identifié un QTL (QTsc.ndsu-1A) conférant une résistance aux deux races 1 et 3. Faris et Friesen (2005) ont identifié deux QTL (QTs.fcu-1B et

QTLs.fcu-3B) conférant une résistance à quatre races, 1, 2, 3 et 5. Une résistance contrôlée par QTL a été identifiée sur le chromosome 3B, conférant de bons niveaux de résistance à toutes les races connues de *P. tritici-repentis* (Kariyawasam *et al.*, 2016).

Des études des QTL dans le blé hexaploïde ont montré que l'interaction *Ptr ToxA-Tsn1* était importante pour le développement de la tache auréolée (Chu *et al.*, 2008b ; Singh *et al.*, 2008c ; Liu *et al.*, 2017 ; Kariyawasam *et al.*, 2018).

Kariyawasam *et al.* (2016) ont identifié une résistance QTL à effet majeur non spécifique à une race, sur le chromosome 3BL, et ont caractérisé des relations génétiques de ce QTL avec les interactions, *Ptr ToxA/Tsn1* et *Ptr ToxC/Tsc1*. Un autre QTL a été détecté à l'extrémité distale du chromosome 1AS conférant une résistance aux isolats producteurs de *Ptr ToxC*, une région qui correspond à l'emplacement connu du locus *Tsc1* (Kariyawasam *et al.*, 2016).

Shankar *et al.* (2017) ont rapporté que les QTL sur les chromosomes 1A et 2A avaient des effets majeurs sur la résistance à la tache auréolée, et un effet additif à celui du gène *tsn1* sur 5BL. Liu *et al.* (2019) ont évalué quatre populations de blé tétraploïde à l'égard d'un isolat de la race 2, qui produit la *Ptr ToxA* ; ils ont trouvé également plusieurs QTL qui peuvent conférer des niveaux élevés de résistance.

Des études d'association et de cartographie des QTL biparentaux, ont montré que tous les chromosomes du blé sauf le 6D, sont porteurs de QTL associés à une résistance ou une sensibilité à la tache auréolée (Kariyawasam *et al.*, 2018).

Les résultats mentionnés montrent le haut niveau de la complexité des interactions blé/*P. tritici-repentis* et suggèrent que des gènes autres que *Tsn1*, *Tsc2*, et *Tsc1* ayant des rôles importants doivent encore être identifiés (Liu *et al.*, 2019). Cependant, une autre forme de résistance connue sous le nom de résistance des plantes adultes (APR : Adult-Plant Resistance), ajoute un niveau de complexité au pathosystème blé/*P. tritici-repentis*, qui est également affecté par le matériel génétique, la variabilité entre les différentes races de *P. tritici-repentis*, les effets d'effecteurs multiples, et la présence d'effecteurs non caractérisés (Ali *et al.*, 2002 ; Faris *et al.*, 2013 ; Manning *et al.*, 2013 ; Dinglasan *et al.*, 2016).

#### **II.6.4. Sources de résistance chez le blé, à l'égard du *P. tritici-repentis***

Plusieurs études effectuées fournissent des exemples de bonnes sources de résistance à la tache auréolée. En effet, de nombreuses études ont été menées pour évaluer des collections de variétés de blé (Lamari *et al.*, 1991 ; Tran *et al.*, 2017 ; Dinglasan *et al.*, 2018 ; See *et al.*, 2019 ; Corsi *et al.*, 2020), des accessions d'*Aegilops tauschii* (Siedler *et al.*, 1994), des parents de blé

tétraploïde (Lamari *et al.*, 1991 ; Chu *et al.*, 2008a), des lignées hybrides (Singh *et al.*, 2008c), des espèces de blé sauvages et de celles lui étant apparentées (wheat-alien species) (Oliver *et al.*, 2008), des lignées de blé hexaploïde synthétique (Siedler *et al.*, 1994 ; Friesen *et al.*, 2008), et des lignés issues de croisement entre des espèces d'orge et du blé (Sillero et Rubiales, 2012).

Dans chaque cas, de nombreuses sources de résistance ont été identifiées et considérées comme utiles pour l'incorporation dans les programmes de sélection du blé, et pour le développement de la résistance à la tache auréolée.

## **II.7. Approches moléculaires utilisées pour l'étude des gènes de virulence**

Toute analyse moléculaire dépend d'un pathosystème bien caractérisé. Diverses méthodes comparatives sont disponibles pour l'étude des gènes de virulences des champignons phytopathogènes telles que les marqueurs moléculaires, le séquençage du génome, les analyses des protéines (protéomique), les éléments transposables...etc.

Le séquençage d'ADN est devenu un outil essentiel en biologie moléculaire (Lamoril *et al.*, 2008). Plusieurs méthodes sont utilisées ; Next Generation Sequencing (NGS), RNA-sequencing technology, Illumina sequencing...etc. Actuellement, la technologie de séquençage de l'ARN est apparue comme une approche rentable dans la détermination de séquences à haut débit pour la découverte plus rapide de gènes fonctionnels (Getachew *et al.*, 2020). Dans ce contexte de nombreux travaux ont utilisé le séquençage pour l'étude et l'identification des gènes de virulence chez les champignons phytopathogènes ; le genre *Fusarium* (Lievens *et al.*, 2009 ; Williams *et al.*, 2016), le genre *Colletotrichum* (Bhadauria *et al.*, 2015 ; Baroncelli *et al.*, 2016 ), *P. tritici-repentis* (Manning *et al.*, 2013 ; Moffat *et al.*, 2014 ; Moolhuijzen *et al.*, 2018), *Leptosphaeria maculans* (Rouxel et Balesdent, 2005).

L'analyse du transcriptome se concentre principalement sur les changements d'expression des gènes chez les individus affectés par rapport aux individus non affectés, mais elle permet également de comprendre la fonction coordonnée de plusieurs gènes en examinant les réseaux de coexpression (Mehta *et al.*, 2018). L'analyse du transcriptomes a été utilisée pour l'identification des gènes de virulence chez plusieurs agents pathogènes tels que *Sclerotinia sclerotiorum* avec divers hôtes (Westrick *et al.*, 2019 ; Chittem *et al.*, 2020), *Colletotrichum fructicola* (Zhang *et al.*, 2018) et *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Qin *et al.*, 2017).

Par ailleurs, le clonage sur carte a été une méthode courante pour identifier les gènes de virulence chez les champignons phytopathogènes tels que *Magnaporthe grisea* (Talbot *et al.*, 1993), *Cochliobolus sativus* (Zhong *et al.*, 2002) et *Zymoseptoria tritici* (Zhong *et al.*, 2017). La

disponibilité d'assemblages de génomes de référence de bonne qualité, de programmes d'annotation des gènes, et de prédiction des gènes effecteurs, a également modifié le clonage sur carte pour en faire un outil plus puissant d'identification des facteurs/gènes de virulence (Manning *et al.*, 2013 ; Moolhuijzen *et al.*, 2018).

La transformation par *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) auparavant limitée à la transformation de l'ADN des plantes, a été réalisée pour la transformation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Bundock *et al.*, 1995). Elle a été ensuite, exploitée pour plusieurs travaux sur les champignons phytopathogènes (Nakamura *et al.*, 2012). L'ATMT génère un pourcentage élevé de transformants stables et un ADN à copie unique intégrée, ce qui est utile pour l'isolement des gènes marqués (Michielse *et al.*, 2005 ; Frandsen, 2011). Ainsi, la méthode de l'ATMT a été utilisée dans de nombreux travaux qui ont étudié les gènes de virulence chez les champignons phytopathogènes tels que *Guignardia citricarpa* (Figueiredo *et al.*, 2010), *Helicobasidium mompa* (Kano *et al.*, 2011), *Curvularia lunata* (Liu *et al.*, 2010), *Magnaporthe grisea* (Rho *et al.*, 2001), *Blastocladiella emersonii* (Vieira et Camilo, 2011), *Cladosporium cladosporioides* (Zhang *et al.*, 2011).

Il est enfin à signaler que l'étude des éléments transposables, ainsi que les régions riches en répétitions, a constitué une approche fructueuse pour l'étude des gènes de virulence chez les champignons phytopathogènes ces dernières années.

Les champignons phytopathogènes fournissent des exemples éminents d'associations avantageuses entre des éléments transposables (ET) en évolution rapide, et des gènes de virulence qui provoquent des variations dans les phénotypes de virulence (Moller et Stukenbrock, 2017). L'association entre régions riches en ET et effecteurs est retrouvée chez la plupart des espèces de champignons filamenteux ou d'oomycètes phytopathogènes ; *Magnaporthe grisea* (Orbach *et al.*, 2000), *Fusarium* (Davière *et al.*, 2010), *Cladosporium fulvum* et *Dothistroma septosporum* (De Wit *et al.*, 2012), *P. tritici-repentis* (Manning *et al.*, 2013) et *Blumeria graminis* (Hacquard *et al.*, 2013).

Les phénomènes d'invasion/expansion par les ET concourent à des remaniements chromosomiques et potentiellement à la génération de nouvelles espèces (Grandaubert *et al.*, 2013). Dans le cas de *Leptosphaeria maculans*, des phénomènes d'hypermutableté sont fréquents et expliquent la rapidité avec laquelle on observe des contournements de résistance variétale au champ (Grandaubert *et al.*, 2013). Ceci est aussi probable dans de nombreux autres cas de champignons phytopathogènes pour lesquels les gènes codant des effecteurs et/ou des



gènes d'avirulence, sont localisés dans des régions génomiques riches en ET (Grandaubert *et al.*, 2013)

Dans le cas de *L. maculans*, chez qui les régions codantes des effecteurs étaient beaucoup plus proches des ET que d'autres gènes (Rouxel *et al.*, 2011), le génome caractérisé par l'expansion récente mais massive, de quelques familles d'éléments transposables. Ceci a sans doute surtout contribué à la diversification de molécules de type « effecteurs », donc à l'acquisition de nouvelles spécificités parasitaires (Grandaubert *et al.*, 2013). Ceci a un effet direct sur l'adaptation aux résistances variétales en favorisant une diversité d'événements mutationnels, comme il a été constaté chez certains isolats de *Magnaporthe oryzae* qui s'adaptent rapidement aux nouveaux gènes de résistance du riz (Chuma *et al.*, 2011).

Les régions riches en répétitions contiennent souvent des gènes codant pour des protéines impliquées dans les interactions hôte-pathogène. La plasticité des régions riches en répétitions affecte l'émergence de la virulence, notamment par l'inactivation des gènes, l'altération de la séquence ou de la structure des gènes, et la naissance de nouveaux gènes (Raffaele et Kamoun, 2012). Plusieurs travaux antérieurs ont été effectués pour élucider le rôle de ces régions chez les champignons phytopathogènes ; ainsi, Rao *et al.* (2018) ont montré que ces régions ont été significativement associées aux effecteurs et aux gènes du métabolisme secondaire chez l'agent pathogène de l'antracnose du piment, *Colletotrichum truncatum*.

Des conclusions similaires ont été faites pour d'autres champignons comme *Blumeria graminis* et *Phytophthora infestans*, chez lesquels les protéines sécrétés et les gènes effecteurs étaient étroitement associés à des éléments répétitifs (Derbyshire *et al.*, 2017). La comparaison des séquences complètes du génome de 15 agents de la famille des *Clavicipitaceae* a permis de révéler la présence/absence fréquente de polymorphismes et de variations de séquences dans des groupes de gènes impliqués dans la biosynthèse d'alcaloïdes situés dans des régions riches en répétitions (Scharidl *et al.*, 2013). Chez *Sclerotinia sclerotiorum*, il a été montré que ces régions jouent un rôle important dans l'évolution des gènes de virulence (Derbyshire *et al.*, 2017). Les régions riches en répétitions présente un mécanisme de base à l'évolution adaptative (Raffaele et Kamoun, 2012 ; Croll et McDonald, 2012).

Enfin il est à rappeler, qu'à l'heure actuelle, la PCR quantitative en temps réel est une méthode spécifique, sensible et reproductible pour la quantification des acides nucléiques tels que l'ARNm (Bustin, 2002 ; Arya *et al.*, 2005 ; Amaike *et al.*, 2008). Cette méthode a été utilisée dans plusieurs travaux pour l'étude et la détection des gènes de virulence chez les isolats de *P. tritici-repentis* (Amaike *et al.*, 2008).

## **II.8. Aperçus des marqueurs moléculaires utilisés pour l'analyse de la diversité génétique des champignons phytopathogènes**

Les méthodes moléculaires sont universellement applicables et permettent d'explorer le polymorphisme à différents niveaux (comparaison entre des souches, des espèces, des genres, etc.) (Verscheure *et al.*, 2002). Plusieurs marqueurs moléculaires existent ; les SCoT (Start Codon Targeted), la RFPL (Restriction Fragment Length Polymorphism), l'amplification des ITS (Internal Transcribed sequence), la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) et les microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat).

Les marqueurs SCoT sont des marqueurs dont le nom fait référence à la fonction de la séquence ciblée ; ils révèlent en effet un polymorphisme ciblé par le codon de départ, il touche la courte région conservée au niveau des séquences flanquantes le codon d'initiation de la traduction « ATG » (Collard et Mackill, 2009). Les marqueurs sont produits par PCR en utilisant à chaque fois une seule amorce ; les amorces sont conçues à partir de la courte région conservée flanquant le codon d'initiation ATG, qui est conservé pour tous les gènes (Collard et Mackill, 2009). Les produits obtenus sont généralement reproductibles (Gorji *et al.*, 2011).

Les microsatellites sont constitués de séquences de dinucléotides, trinuécléotides ou tétranucléotides répétés en tandem (Frisvad *et al.*, 1998). Ces éléments sont uniformément répartis en plusieurs exemplaires sur l'ensemble du génome d'une espèce et présentent un taux de polymorphisme élevé (Cantarella et D'Agostino, 2015). Ces microsatellites sont très utilisés car ils sont très polymorphes entre les souches, co-dominants, très informatifs, multi-alléliques, expérimentalement reproductibles, et transférables entre espèces apparentées par rapport à d'autres marqueurs (Verscheure *et al.*, 2002). En particulier, les SSR sont utiles dans les études de la diversité ; pour estimer le flux de gènes et les taux de croisement ; et dans les études évolutives, surtout pour déduire les relations génétiques intra-spécifiques (Mason, 2015).

La technique AFLP est basée sur l'amplification sélective par PCR de fragments de restriction à partir d'une digestion totale de l'ADN génomique (de Vicente *et al.*, 2003). La prise d'empreintes génétique, implique la révélation d'un ensemble de fragments d'ADN provenant d'un échantillon d'ADN spécifique (Vos *et al.*, 1995). L'amplification sélective est réalisée par l'utilisation d'amorces qui s'étendent dans les fragments de restriction, amplifiant uniquement les fragments dans lesquels les extensions d'amorces correspondent aux nucléotides flanquant les sites de restriction (Vos *et al.*, 1995). La méthode permet la co-amplification spécifique d'un grand nombre de fragments de restriction.

La technique connue communément par RAPD a été l'une des techniques moléculaires les plus couramment utilisées pour développer des marqueurs d'ADN (Senthil et Gurusubramanian, 2011). La RAPD est une modification de la PCR dans laquelle une amorce oligonucléotidique unique, courte (10 bases de long) et arbitraire, est utilisée. Cette dernière est capable de s'hybrider, et de s'amorcer à plusieurs endroits du génome produisant ainsi un spectre de produits d'amplification qui sont caractéristiques de l'ADN matrice (Senthil et Gurusubramanian, 2011). Les marqueurs RAPD ont trouvé une large gamme d'applications. Ceci est principalement dû à la rapidité, au coût et à l'efficacité de la technique (Senthil et Gurusubramanian, 2011). Elle présente également l'avantage qu'aucune connaissance préalable du génome à l'étude n'est nécessaire (Senthil et Gurusubramanian, 2011).

Les séquences Inter-simple sequence repeats (ISSR) sont des régions du génome flanqué de séquences microsatellite. L'amplification par PCR de ces régions donne des produits d'amplifications multiples qui peuvent être utilisés comme système de marqueurs multilocus dominants (Ng et Tan, 2016). Les marqueurs ISSR sont faciles à utiliser, peu coûteux et moins exigeants sur le plan méthodologique que les autres marqueurs (Ng et Tan, 2015). Les marqueurs ISSR sont très polymorphiques et sont utiles pour les études sur la diversité génétique, la phylogénie, le marquage des gènes, la cartographie du génome et la biologie de l'évolution (Reddy *et al.*, 2002).

La technique RFLP, est basée sur la restriction enzymatique, elle s'agit d'une technique à travers laquelle les polymorphismes de longueur des fragments de restriction sont identifiés en utilisant les enzymes de restriction qui coupent l'ADN uniquement sur des sites de restriction déterminés (Rasmussen, 2012). Après électrophorèse, les fragments séparés sont hybridés avec un ADN sonde (Hamon *et al.*, 2013). Un polymorphisme de restriction peut aussi être détecté en examinant les profils des fragments de restriction générés suite à la digestion, sans utilisation des sondes. La restriction enzymatique est souvent pratiquée sur les séquences ITS après leur amplification par PCR. En effet, parmi les nombreuses méthodes utilisées par cette technique, celle de l'utilisation des séquences ITS (Viaud *et al.*, 2000). C'est une méthode sensible et fiable qui facilite l'identification rapide et facile des espèces fongique. De plus, cette méthode permet d'étudier en profondeur la diversité des champignons filamenteux (Diguta *et al.*, 2011).

---

## **III- Matériel Et Méthodes**

---

Les travaux réalisés dans cette thèse ont été envisagés pour la réalisation de deux principaux objectifs : (i) l'étude de la variabilité du gène de virulence ToxA chez une collection d'isolats de *P. tritici-repentis* originaires d'Afrique du nord (Algérie et Tunisie) et du moyen orient (Syrie), et (ii) la recherche de sources de résistance à l'égard des deux races 1 et 5.

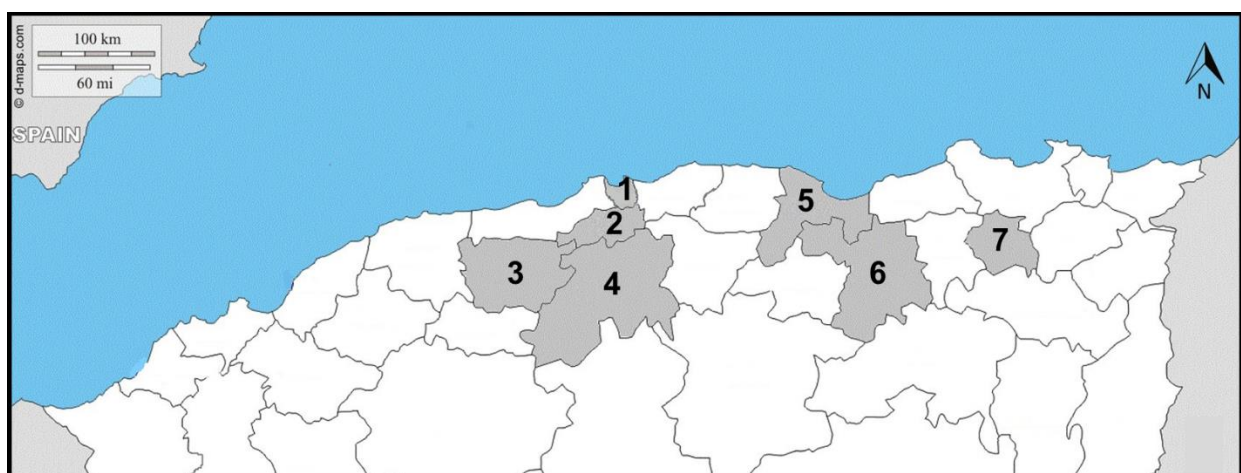
### III.1. Matériel

Le matériel biologique utilisé lors de ce travail est constitué d'isolats de l'agent causal de la tache auréolée, *P. tritici-repentis*, et de génotypes de blé. Ceux-ci, comportent des lignées améliorées, des variétés locales, ainsi que des variétés homologuées.

#### III.1.1. Matériel fongique

Durant nos travaux, 213 isolats ont été utilisés ; ils proviennent de différentes régions céréalières de 3 pays ; Algérie, Tunisie et Syrie (Annexe 1).

En effet une prospection a été réalisée sur les cultures de blé, durant les deux campagnes agricoles 2014/15 et 2015/16, dans différentes régions céréalières d'Algérie. La prospection a touché aussi bien les cultures de blé dur que celles de blé tendre. Elle a été basée sur l'observation du symptôme typique de la tache auréolée, caractérisé par une nécrose de forme ovale entourée par une chlorose régulière. Les feuilles de blé ont été récoltées dans 15 localités (Alger, Blida, Béjaïa, El-Kseur, Semaoun, Akbou, Oued Ghir, El-Amra, Ferme expérimentale de l'ENSA (Beaulieu), Station expérimentale ENSA, Sétif, Oued El-Alleug, Médéa, Oued Smar, El-Khroub), appartenant à 7 Wilaya (Fig. 8). Suite à cette prospection 87 Isolats ont été obtenus.



**Figure 8 :** Régions céréalières prospectées en Algérie durant la saison 2014/2015 et 2015/2016. 1 : Alger ; 2 : Blida ; 3 : Ain Defla ; 4 : Médéa ; 5 : Béjaïa ; 6 : Sétif ; 7 : Constantine.

Par ailleurs 66 isolats provenant de différentes régions céréalières en Syrie ; 44 provenant d'Algérie et 16 provenant de Tunisie, ont également fait l'objet de nos travaux. Il s'agit de collections d'isolats constituées durant des années antérieures (Annexe 1).

De même, deux souches de référence de *P. tritici-repentis* ont été utilisées ; il s'agit de la souche Pti2 (référence pour la race 1) et de la souche DW7 (référence pour la race 5) ; ils nous ont été fournis par le Dr. ALI Shaukat., South Dakota State University (SDSU), USA.

### III.1.2. Matériel végétal

Cent seize (116) génotypes ont été utilisés pour la recherche de sources de résistance à l'égard des deux races 1 et 5 de l'agent causal de la tache auréolée. Le matériel végétal évalué, est composé de 25 lignées améliorées, 54 variétés locales, 37 variétés homologuées. Les génotypes ont été fournis par l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA) (Annexe 2).

Les lignées ont été sélectionnées dans le cadre du programme national de sélection du blé mené par le même institut (INRAA). Ce sont toutes des lignes F7, obtenues par un processus de sélection généalogique en masse (Benbelkacem, données non publiées). Les variétés locales proviennent de la collection nationale de blé, multipliée par le même institut. Une partie de ces dernières ont été choisies parmi les blés cultivés à Adrar et Tamanrasset (Oumata *et al.*, 2020) ; les agriculteurs affirment qu'il s'agit de génotypes locaux cultivés depuis longtemps dans cette région.

Par ailleurs cinq génotypes de blé ont été utilisés lors de l'identification des races. Quatre génotypes de blé tendre composent la gamme différentielle standards ; il s'agit de Glenlea, Salamouni, 6B-662 et 6B-365. A ceux-ci a été ajouté Coulter, qui est une variété de blé dur (Tableau II). Les variétés Salamouni et Glenlea ont été aussi utilisés en tant que témoin résistant, et sensible successivement, lors de la recherche des sources de résistance.

**Tableau II :** Type de réaction de la gamme différentielle à l'égard des huit races connues.

Races Génotypes	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
Glenlea	S-N	S-N	R	R	R	R	S-N	S-N
6B662	R	R	R	R	S-C/b	S-C/b	S-C/b	S-C/b
6B365	S-C/c	R	S-C/c	R	R	S-C/c	R	S-C/c
Salamouni	R	R	R	R	R	R	R	R
Coulter	S-N	S-N	S-N	R	S-N	S-N	S-N	S-N

**S-N** = sensible avec nécrose induite par la toxine Ptr ToxA ; **S-C/b** = sensible avec chlorose induite par la toxine Ptr ToxB ; **S-C/c** = sensible avec chlorose induite par la toxine Ptr ToxC ; **R** = résistance.

## III.2. Méthodes

### III.2.1. Isolement monospore du pathogène

La méthode utilisée consiste à couper les feuilles infectées en petits fragments de 1 à 2 cm au niveau de la lésion, et de les plonger directement dans de l'hypochlorite de sodium (eau de javel à 5°) pendant trois minutes pour une désinfection superficielle. Puis les fragments sont rincés trois fois avec de l'eau distillée stérile ; chaque rinçage dure trois minutes, ce qui permet d'éliminer toutes traces d'eau de javel. Les fragments sont déposés ensuite dans des boîtes de Pétri en verre préalablement stérilisées à 150 °C, dans lesquelles un papier buvard humidifié avec de l'eau distillée stérile a été disposé.

Les boîtes sont incubées sous lumière blanche continue pendant 18 h à environ 20 °C, puis à l'obscurité pendant 24 h à 15 °C. Après l'apparition des conidies, elles sont identifiées selon deux critères ; (1) la forme et la germination ; le genre *Drechslera* est caractérisé par des conidies cylindriques pouvant germer à partir de n'importe quelle cellule. (2) la forme de la cellule apicale de la conidie ; l'agent causal *Drechslera tritici-repentis* est reconnu par sa cellule apicale en forme de tête de serpent. Ces conidies sont par la suite récupérées séparément et aseptiquement sous loupe binoculaire, à l'aide d'une pipette Pasteur étirée finement, puis déposées sur un milieu de culture V8-PDA (Jus V8 : 150 ml, agar 2 %, pomme de terre 20 %, CaCO<sub>3</sub> : 3 g), dont la préparation est indiquée en Annexes 3 et 4.

### III.2.2. Conservation en disques de gélose séchés

Des disques sont prélevés à partir d'une colonie de *P. tritici-repentis* bien développée sur milieu V8-PDA, indemne de toutes contaminations. Ils sont déposés dans de nouvelles petites boîtes de Pétri stériles, celles-ci sont laissées sous une haute à flux laminaire pendant toute la nuit. Les disques ainsi desséchés, sont récupérés le lendemain dans des tubes Eppendorf de 2ml, préalablement stérilisés à l'autoclave, et enfin conservés à -18 °C. Toutes ces étapes ont été réalisées dans des conditions d'asepsie.

### III.2.3. Caractérisation morphologique des isolats

Afin de vérifier la présence d'une variabilité morphologique chez le *P. tritici-repentis*, les 76 isolats algériens obtenus lors de nos prospections ont été repiqués individuellement sur milieu PDA (Annexe 5) et incubées à l'obscurité à 20 °C pendant une semaine. Des fragments de 6 mm de diamètre ont été prélevés à partir de la périphérie des colonies, et repiqués dans des boîtes contenant du milieu PDA fraîchement préparé. Les boîtes ont été incubées à 20 °C en l'obscurité,

puis les caractères macroscopiques (couleur et texture du mycélium, couleur du pigment produit et formation de secteurs) de chaque colonie ont été enregistrés au bout de 7 jours. Le milieu PDA a été choisi pour cette étape car il est couramment utilisé pour l'isolement et la croissance de nombreux champignons.

#### **III.2.4. Etude de la croissance mycélienne des isolats**

La croissance radiale des cultures a été déterminée sur milieu PDA, à 25 °C, et sous obscurité. Cette température a été choisie car elle a été déterminée comme optimale pour la croissance de *P. tritici-repentis* (Benslimane *et al.*, 2017). A partir de chaque isolat obtenu par culture monospore et cultivé préalablement sur milieu PDA, un disque de 6 mm de diamètre a été prélevé à partir de la périphérie de la colonie et déposé au centre d'une boîte de Pétri, contenant un milieu PDA, le mycélium vers le bas. Des mesures quotidiennes de la croissance radiale des colonies ont été réalisées pendant 7 jours sous une loupe binoculaire étalonnée. La mesure de la croissance des colonies a été estimée à partir du moment où le mycélium commence à coloniser la périphérie du disque. La moyenne des deux rayons opposés de la colonie, et développés à partir du disque a été évaluée. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque isolat. Les valeurs moyennes ont été utilisées pour effectuer l'analyse statistique à travers le test de Kruskal-Wallis (alternative non paramétrique de l'ANOVA) à l'aide du logiciel SPSS (Version 23.0)

#### **III.2.5. Evaluation du pouvoir de sporulation des isolats *in vitro***

L'intensité de la sporulation des différents isolats obtenus durant les saisons 2014-2015 et 2015-2016, a été évaluée.

##### **III.2.5.1. Induction de la sporulation**

La production de spores a été réalisée comme décrit par Lamari et Bernier (1989c). Un disque de 6 mm de diamètre a été prélevé à partir de la périphérie d'une culture monospore et déposé au centre d'une boîte de Pétri de 9 cm contenant un milieu V8-PDA fraîchement préparé. Les boîtes ont été incubées à l'obscurité à environ 22 °C pendant 5 jours jusqu'à l'obtention d'une colonie dont la croissance atteint 2 cm du bord de la boîte. Ensuite, le mycélium a été rabattu, en utilisant le fond d'un tube à essai passé à la flamme au préalable. Les boîtes ont été incubées sous lumière blanche continue pendant 18 h à environ 20 °C, puis à l'obscurité pendant 24 h à environ 15 °C. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque isolat.



### **III.2.5.2. Préparation des suspensions de spores**

Après la formation des spores observées sous une loupe binoculaire, un disque de 6 mm a été prélevé de chacune des boîtes à l'aide d'un emporte-pièce. Il a été introduit dans un tube Eppendorf de 2 ml contenant 1 ml d'eau distillée préalablement stérilisée ; trois répétitions sont ainsi réalisées. Les tubes sont par la suite vigoureusement agités par un passage au vortex, pendant 60 secondes.

### **III.2.5.3. Comptage des spores et analyses statistiques**

A partir de chaque suspension, trois préparations à raison de 10 µl chacune, ont été déposées sur une lame porte objet, et recouvertes séparément par des lamelles ; ainsi au total 9 préparations pour chaque isolat ont été utilisées. Le dénombrement des conidies a été possible suite à l'observation des préparations sous un microscope optique (grossissement 10x10). Cette observation a été menée soigneusement, de la droite vers la gauche et du haut vers le bas. La moyenne des spores produites par cm<sup>2</sup> de culture mycélienne par répétition, et pour chaque isolat a été considéré. Enfin, et dans le but de comparer entre les isolats, une analyse statistique a été réalisé à travers le test de Kruskal-Wallis (alternative non paramétrique de l'ANOVA) à l'aide du logiciel SPSS (Version 23.0)

### **III.2.6. Analyse de la diversité génétique des isolats *P. tritici-repentis* par les marqueurs moléculaires**

Afin d'évaluer la diversité génétique présente au sein de la collection de la population algérienne de *P. tritici-repentis*, plusieurs marqueurs moléculaires ont été testés, puis deux ont été utilisés pour l'analyse de la variabilité. L'évaluation a concerné 85 isolats de la collection constituée lors des prospections effectuées dans les différentes régions céréalière du pays pendant les deux campagnes agricoles 2014-2015 et 2015-2016 (Tableau III).

#### **III.2.6.1. Culture des isolats**

À partir de la périphérie d'une culture monospore de chaque isolat, des disques de 6 mm de diamètre ont été prélevés et mis en culture dans des flacons en verre stériles de 250 ml, contenant 100 ml du milieu PDB (Potato Dextrose Broth) (Pomme de terre 20 %, glucose 2 %) (Annexe 6). Les flaconsensemencés ont été incubés pendant 10 à 12 jours sur un agitateur rotatif orbital (150 t/mn) à la température ambiante d'environ 20 °C. Le mycélium des différents isolats, a été récupéré de chaque flacon par filtration à travers deux couches de papier filtre Whatman 1 (Cat No 1001 090), puis conservé à -18 °C jusqu'à l'extraction d'ADN.

### **III.2.6.2. Extraction d'ADN**

L'ADN a été extrait à partir du mycélium des 85 isolats (Tableau III) selon le protocole de Promega (1978) modifié. La préparation des différentes solutions utilisées est détaillée en Annexe 7.

A cet effet, 200 mg de mycélium lyophilisé de chacun des isolats ont été pesés dans un tube Eppendorf de 2 ml. Il a été broyé dans de l'azote liquide en présence de billes d'acier inoxydable ( $\varnothing = 5$  mm), et moyennant un broyeur de tissus (Tissue Lyser II, QIAGEN), pendant 5 min jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. 600  $\mu$ l de la solution de lyse (50 mM Tris-base pH : 7.4, 50 mM EDTA, 1 % SDS) ont été ajoutée ; puis le contenu du tube a été homogénéisé par un passage au vortex. Les tubes ont été incubés à 65 °C dans un bain Marie durant 15 mn. La solution de précipitation des protéines (Acétate de sodium 3 M) a été ajoutée au lysat à raison de 200  $\mu$ l par tube, ces derniers ont été mélangés avec un vortex durant 20 secondes, puis centrifugés durant 10 mn à 13000g.

Après la centrifugation, le surnageant est récupéré dans un nouveau tube de 2 ml, et un volume égal d'une solution de phénol-chloroforme (50:50) a été ajouté. Le contenu des tubes est homogénéisé délicatement par inversion des tubes. Après une centrifugation à 13000g pendant 10 mn, le surnageant est pipeté délicatement pour éviter de récupérer les protéines, et transféré dans un nouveau tube de 1,5 ml. Un volume égal de chloroforme est alors ajouté au surnageant récupéré, et le contenu du tube est délicatement mélangé par inversion de celui-ci. Après une centrifugation à 13000g durant 10 mn, le surnageant est pipeté délicatement et transféré dans un nouveau tube dans lequel l'ADN sera précipité.

L'ADN est précipité, en ajoutant 600  $\mu$ l d'isopropanol froid au surnageant transféré ; ces tubes sont homogénéisés en les inversant délicatement, puis ils ont été incubés à 4 °C pendant 30 mn. Les tubes sont centrifugés à 13000g pendant 5 mn, le culot d'ADN formé précipite, et l'alcool composant le surnageant est jeté, puis l'ADN est lavé deux fois avec de l'Ethanol à 70% (500  $\mu$ l dans chaque tube). Après une dernière centrifugation pendant 5 mn à 13000g, les tubes contenant uniquement le culot d'ADN, sont déposés sur du papier absorbant sur la pailleasse à la température ambiante, afin de permettre l'évaporation totale de l'Ethanol.

Après le séchage de l'ADN, il est dilué dans 100  $\mu$ l de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH : 8). Les ADN sont conservés au congélateur jusqu'à leur utilisation.

**Tableau III :** Isolats de *P. tritici-repentis* utilisés pour l'étude de la diversité génétique.

N°	isolat	N°	Isolat	N°	Isolat	N°	isolat
1	Ptr 16.1.1	23	Ptr 16.8.3	45	Ptr 16.16.1	67	Ptr 16.24.1
2	Ptr 16.1.2	24	Ptr 16.9.1	46	Ptr 16.16.2	68	Ptr 16.24.2
3	Ptr 16.1.3	25	Ptr 16.9.2	47	Ptr 16.16.3	69	Ptr 16.24.3
4	Ptr 16.2.1	26	Ptr 16.9.3	48	Ptr 16.17.1	70	Ptr 16.25.1
5	Ptr 16.2.2	27	Ptr 16.10.1	49	Ptr 16.17.2	71	Ptr 16.25.2
6	Ptr 16.2.3	28	Ptr 16.10.2	50	Ptr 16.17.3	72	Ptr 16.25.3
7	Ptr 16.3.1	29	Ptr 16.10.3	51	Ptr 16.18.1	73	Ptr 16.25.4
8	Ptr 16.3.2	30	Ptr 16.11.1	52	Ptr 16.18.3	74	I 2.4
9	Ptr 16.3.3	31	Ptr 16.11.2	53	Ptr 16.19.1	75	I 2.6
10	Ptr 16.4.2	32	Ptr 16.11.3	54	Ptr 16.19.2	76	I 2.21
11	Ptr 16.4.3	33	Ptr 16.12.1	55	Ptr 16.19.3	77	I 7.8
12	Ptr 16.5.1	34	Ptr 16.12.2	56	Ptr 16.20.1	78	5.3
13	Ptr 16.5.2	35	Ptr 16.12.3	57	Ptr 16.20.2	79	5.11
14	Ptr 16.5.3	36	Ptr 16.13.1	58	Ptr 16.20.3	80	7.9
15	Ptr 16.6.1	37	Ptr 16.13.2	59	Ptr 16.21.1	81	13.13
16	Ptr 16.6.2	38	Ptr 16.13.3	60	Ptr 16.21.2	82	16.2
17	Ptr 16.6.3	39	Ptr 16.14.1	61	Ptr 16.21.3	83	16.5
18	Ptr 16.7.1	40	Ptr 16.14.2	62	Ptr 16.22.1	84	16.7
19	Ptr 16.7.2	41	Ptr 16.14.3	63	Ptr 16.22.3	85	90.2
20	Ptr 16.7.3	42	Ptr 16.15.1	64	Ptr 16.23.1		
21	Ptr 16.8.1	43	Ptr 16.15.2	65	Ptr 16.23.2		
22	Ptr 16.8.2	44	Ptr 16.15.3	66	Ptr 16.23.3		

### III.2.6.3. Evaluation de la qualité et de la quantité de l'ADN extrait

La quantité et la qualité de l'ADN extrait ont été évaluées successivement par le dosage au NanoDrop, et électrophorèse sur gel d'agarose. Les dosages au NanoDrop permettent de mesurer

à la fois la concentration et la pureté de l'ADN ; la concentration est donnée directement, alors que la présence des protéines a été vérifiée par la valeur du rapport Do260/Do280 nm. Cette valeur doit être comprise entre 1,8 et 2 ; un rapport inférieur à 1,8 indique la présence de protéines.

Le test de qualité a consisté en la réalisation d'une électrophorèse sur un gel d'agarose de 0,8 % dans un tampon de TAE 1X (2M Tris-base, 0.05M EDTA, 1M acide acétique, pH : 8). Le tampon de révélation RedSafe est ajouté après refroidissement du flacon à raison de 5 µl par 100 ml de gel, puis le gel est coulé. Par la suite, 5 µl de l'ADN de chaque échantillon est mélangé avec 2 µl du tampon de charge (20 mM Tris-HCl, pH : 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), le tout est déposé dans les puits confectionnés dans le gel. Les échantillons sont enfin exposés à un champ électrique de 100 V pour migration pendant 20 min. Après la fin de la migration, le gel est exposé aux lumières Ultraviolets pour la visualisation. L'intégrité de l'ADN et l'absence de dégradation sont vérifiées par l'absence de Smear.

La concentration des ADN extraits a été ajustée à 10 ng/µl, pour toutes les réactions d'amplification effectuées.

#### **III.2.6.4. Sélection des marqueurs moléculaires utilisés lors l'analyse de la diversité génétique**

Plusieurs marqueurs moléculaires ont été testés à savoir : ITS, ISSR, RAPD, RFLP, SCoT et SSR, l'objectif étant de choisir les marqueurs adéquats, pour l'étude envisagé et qui montrent le plus de polymorphisme.

Les amorces utilisées pour chaque marqueur ainsi que leurs séquences respectives, de mêmes que les enzymes de restriction testés sont présentés en Annexes 8 et 9. Ainsi, de nombreuses optimisations ont été réalisées pour assembler les meilleures conditions des réactions PCR effectuées pour chaque marqueur. Les optimisations réalisées n'ont concerné que quelques échantillons seulement, ils ont été vérifiés par l'électrophorèse sur gel d'agarose. Ces optimisations ont touché différents paramètres : la température d'hybridation, le nombre de cycles d'amplification pendant les réactions PCR, et la concentration d'ADN utilisée dans le mélange réactionnel.

Le marqueur ayant montré un niveau de polymorphisme élevé, a été choisi pour être appliqué sur l'ensemble de la collection. Parmi tous les marqueurs testés, seuls deux marqueurs ont donné des polymorphismes recherchés, il s'agit des marqueurs SCoT et SSR. Ceux-ci ont été par la suite appliqués sur toute la collection pour l'évaluation de la diversité génétique existante.

### III.2.6.5. Analyse de la diversité génétique par les marqueurs SCoT (Start Codon targeted)

Les marqueurs SCoT sont des marqueurs appelés suivant leur fonction, polymorphisme ciblé par le codon de départ, qui est basé sur la courte région conservée dans les gènes entourant le codon de départ (ou d'initiation) de la traduction « ATG » (Collard et Mackill, 2009). Les marqueurs d'ADN sont produits par amplification en chaîne par polymérase (PCR) en utilisant des amorces uniques qui sont conçues à partir de la courte région conservée flanquant le codon de départ de (ATG) qui est conservé pour tous les gènes (Collard et Mackill, 2009). Les produits obtenus sont généralement reproductibles (Gorji *et al.*, 2011).

#### A. Mélange réactionnel

Les réactions d'amplifications ont été réalisées avec le Kit COSMO PCR Master Mix, de Willowfort qui contient les composants suivants : la Taq Polymérase, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, les dNTPs et le tampon (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT and glycérol). Chaque réaction PCR a été préparée dans un volume de 10 µl, comme indiqué dans le tableau IV.

**Tableau IV** : Composition du volume réactionnel utilisé lors des amplifications.

Composant	Volume (µl)	Concentration
COSMO Master Mix	5	/
Amorces (10µM)	1	0.1-0.2 µM
ADN	1	10 ng/µl
EDS	3	/

#### B. Amorces

Les amorces des marqueurs SCoT utilisées pour cette étude, et leurs séquences respectives, sont indiquées dans le tableau V.

Le programme utilisé a consisté en une dénaturation initiale à 94 °C pendant 2 min, suivie par 35 cycles composés chacun d'une dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, une hybridation à 50 °C pendant 40 secondes et une élongation à 72 °C pendant 50 secondes. Ces cycles ont été suivis par une élongation finale à 72 °C pendant 7 min. Les amplifications ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur 2720 Applied Biosystems, USA. La séparation des produits PCR, et leur visualisation ont été effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose de 2 % selon la méthode décrite au chapitre II.2.6.3.

**Tableau V** : Amorces SCoT utilisées pour l'étude de la diversité génétique.

Amorce	Séquence
SCoT 3	5'...CAACAATGGCTACCACCG...3'
SCoT 5	5'...CAACAATGGCTACCACGA...3'
SCoT 16	5'...ACCATGGCTACCACCGAC...3'
SCoT 22	5'...AACCATGGCTACCACCAC...3'
SCoT 28	5'...CCATGGCTACCACCGCCA...3'
SCoT 33	5'...CCATGGCTACCACCGCAG...3'
SCoT 35	5'...CATGGCTACCACCGGCC...3'
SCoT 36	5'...GCAACAATGGCTACCACC...3'

### III.2.6.6. Analyse de la diversité génétique par les marqueurs SSR (simple Sequence Repeat)

Les microsatellites sont constitués de séquences de dinucléotides, trinucléotides ou tétranucléotides répétés en tandem (Frisvad *et al.*, 1998 ; Cantarella et D'Agostino, 2015). Ces éléments sont uniformément répartis en plusieurs exemplaires sur l'ensemble du génome d'une espèce et présentent un taux de polymorphisme élevé (Cantarella et D'Agostino, 2015). Ces microsatellites sont très utilisés pour l'étude de la diversité génétique car ils sont très polymorphes entre les souches, co-dominants et très reproductibles par rapport à d'autres marqueurs (Verscheure *et al.*, 2002 ; Cantarella et D'Agostino, 2015).

#### A. Mélange réactionnel

Les réactions d'amplifications ont été réalisées avec le Kit COSMO PCR Master Mix, qui contient les composants suivants : la Taq Polymérase, le tampon, MgCl<sub>2</sub>, les dNTPs, et le tampon (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT and glycérol). Le protocole adopté pour chaque réaction PCR a été préparé dans un volume de 10 µl, comme indiqué dans le tableau ci-dessous (Tableau VI).

**Tableau VI** : Composition du volume réactionnel utilisé lors des amplifications.

Composant	Volume (µl)	Concentration
COSMO Master Mix	5	/
Amerces (10µM)	1	0.1-0.2 µM
ADN (10 ng)	1	10 ng/µl
EDS	3	/

## B. Amorces SSR utilisées, leurs séquences respectives et leurs températures d'hybridation

Les amorces des marqueurs SSR utilisées pour cette étude, sont celles rapportées par (Hudcovicova *et al.*, 2015), pour la détection de la diversité génétique chez *P. tritici-repentis*. Leurs séquences respectives, les motifs répétés amplifiés, ainsi que la température d'hybridation nécessaire à chaque couple d'amorces, sont indiquées dans le tableau VII.

**Tableau VII :** Amorces SSR utilisées pour la détection de la diversité génétique.

Amorce	Motif	Forward/ Reverse	Séquence	Température d'hybridation
DTR4	(TC) <sub>n</sub>	F	5'...TCAAGCTTTGCTTGGTGTTG...3'	60 °C
		R	5'...GGAATTTTAGTAACCGTCGG...3'	
DTR5	(CT) <sub>n</sub>	F	5'...AGCCTATGCGACCCTAACCT...3'	60 °C
		R	5'...TCCAATCCCAGCGTATCCGA...3'	
DTR6	(GCC) <sub>n</sub>	F	5'...CTCGCTGCAGGATCATTCTT...3'	60 °C
		R	5'...ACGATCCGATCCCCACGAAT...3'	
DTR7	(ATT) <sub>n</sub>	F	5'...AGGCCTGCGAGATACCCTAT...3'	60 °C
		R	5'...ACTGAACCACCATAGTTCGC...3'	
DTR8	(CA) <sub>n</sub>	F	5'...CAGACGCCAAAACGTTTACA...3'	60 °C
		R	5'...TTCTAGGGTTTCGACTGCTT...3'	
DTR9	(AT) <sub>n</sub>	F	5'...AAAGTGGTATAACCCGACAGG...3'	60 °C
		R	5'...TGATTACCCACCGACTTTGC...3'	
DTR10	(TA) <sub>n</sub>	F	5'...TTGGAATGTCTGAAAGACTAGGAA...3'	59 °C
		R	5'...AAAATACGATCCAAGACATTGGTAC...3'	
DTR11	(CG) <sub>n</sub>	F	5'...CCGCCAACTCTTCTGAACTC...3'	59 °C
		R	5'...CTGGACCACGATATCCGAGC...3'	

Le programme utilisé lors des amplifications, a consisté en une dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min suivie par 35 cycles, composé chacun d'une dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, hybridation pendant 30 secondes, et une élongation à 72 °C pendant 40 secondes. Ces cycles ont été suivis par une élongation finale à 72 °C pendant 10 min. Les amplifications ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur « 2720 d'Applied Biosystems, USA ».

### **C. Séparation des produits amplifiés sur gel de polyacrylamide**

La séparation des produits d'amplification a été réalisée sur un gel de polyacrylamide à 9 %. Ce type de gel possède plusieurs avantages, les plus importants sont : la finesse, la résolution et la bonne séparation des bandes de faible poids moléculaire. La préparation du gel nécessite elle-même la préparation de plusieurs solutions composantes (Annexe 10). Pour préparer 100 ml de gel, les volumes des composants sont comme suit :

Eau distillée stérile	30 ml
Solution de polyacrylamide	20 ml
TBE (10X)	7 ml
APS (10 %)	900 µl
TEMED	50 µl

Les solutions APS et TEMED ont été ajoutées en dernier ; ces deux solutions ont été utilisées pour la polymérisation du gel. Avant que le gel ne soit gélifié, il a été coulé entre deux plaques de verres. Les plaques de verre ont été installées au préalable côte à côte en insérant les deux entretoises entre elles, qui ont été correctement serrées avec le joint en silicone pour éviter toute fuite. Après gélification d'environ 15 minutes, les pinces à ressort et le joint en silicone ont été retirés. Le gel ainsi préparé a été placé dans la cuve avec le tampon de migration TBE 1X (2M Tris-base, 1 M Acide Borique, 0,5 M EDTA, pH : 8.0), et le peigne a été enlevé.

Les échantillons ont été déposés dans les puits au sommet du gel à raison de 7µl, puis un courant continu de 200 volts est exercé pour la migration des échantillons. Le marqueur de poids moléculaire 100bp DNA Ladder ; de la société Vivantis, a été utilisé.

### **D. Visualisation des produits amplifiés (SSR)**

La révélation est possible en plongeant le gel dans une solution de SafeRed à raison de 5 µl de SafeRed mélangé dans 400 ml d'eau distillée pendant 5 minutes. A la fin de cette période, le gel est exposé aux lumières UV pour visualiser les produits d'amplification obtenus.



### III.2.6.7. Analyse des données générées par les marqueurs moléculaires

#### A. Collecte des données et construction de la matrice binaire

Les images des gels de migration obtenus par les marqueurs SCoT ont été analysées en ayant recours au logiciel Image Lab (version 6.0.1). Ce dernier a permis d'obtenir pour chaque ADN étudié, le nombre de bandes révélées par chaque amorce ainsi que la taille de chacune de ces bandes. Les données ainsi obtenues ont été transformées en matrice binaire dans laquelle la valeur 1 correspond à la présence d'une bande et la valeur 0 à son absence. Les images des gels de migration obtenues par les marqueurs SSR ont été analysées visuellement, les données ont été également transformées en matrice binaire (1,0).

#### B. Analyse hiérarchique

La classification hiérarchique (Hierarchical Cluster Analysis (HCA)) (Ward, 1963), est une méthode mathématique de classification non supervisée qui permet de grouper des profils selon leur ressemblance statistique. Les données réunies dans la matrice binaire ont fait l'objet d'une analyse hiérarchique en utilisant le programme PAST (Paleontological Statistics) version 1.91. Le coefficient de Jaccard (Legendre et Legendre, 1998) a été choisi pour l'évaluation de la similarité. Ce coefficient a été choisi car il considère que l'absence d'un fragment dans deux profils n'implique pas de ressemblance entre les individus concernés. La mesure de similarité entre profils ne tient donc compte que des fragments communs. En effet, la double absence d'un fragment peut avoir des causes très différentes, alors que la double présence implique nécessairement une ressemblance entre les deux individus. Un dendrogramme a été généré à l'aide de la méthode Unweighted Pair Group Method ; choisie car elle a été utilisée dans la majorité des études génétiques concernant les champignons phytopathogènes. Nous avons également inclus une analyse Bootstrap comportant 1000 replicats qui permet d'estimer la robustesse des nœuds de l'arbre généré. Par conséquent les grandeurs indiquées aux nœuds de chaque clade, représentent les valeurs de Bootstrap. Par ailleurs une matrice de similarité a été obtenue, celle-ci a permis de calculer le pourcentage de similarité entre chaque paire d'isolats.

#### C. Polymorphism information content (PIC)

Le PIC a été évalué pour chaque marqueur Scot et SSR, via le programme iMEC (Online Marker Efficiency Calculator) (<https://irscope.shinyapps.io/iMEC/>) selon Amiryousefi *et al.* (2018). Il permet une estimation de la force de discrimination d'un *locus*. Sa valeur est comprise entre 0 (monomorphisme) et 1 (allèle très hautement discriminant).

### **III.2.7. Etude de la variabilité génétique du gène ToxA**

Le gène de virulence ToxA contrôle la synthèse de la toxine Ptr ToxA, responsable des lésions nécrotiques chez les génotypes de blé sensibles, sa séquence est reconnue pour être très conservée. L'objectif de cette partie de nos travaux est de rechercher une éventuelle variabilité de ce gène chez l'agent de la maladie du tan spot.

#### **III.2.7.1. Culture des isolats et extraction de l'ADN**

Les isolats ont été mis en culture comme indiqué dans le chapitre **III.2.6.1**.

##### **A. Extraction d'ADN**

L'ADN a été extrait à partir du mycélium de 96 isolats préparés comme indiqué, et de 118 isolats collectés durant des années antérieures et dont le mycélium lyophilisé a été conservé depuis 2006 à -78 °C. L'extraction de l'ADN a été réalisée selon le protocole de Promega (1978) modifié.

A cet effet, 200 mg de mycélium lyophilisé de chacun des isolats ont été pesés dans un tube Eppendorf de 2 ml, puis broyés dans de l'azote liquide en utilisant des micros pillons jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Une autre méthode a été aussi utilisée, il s'agit de mettre le mycélium frais récolté de chacun des isolats dans un tube Eppendorf de 2 ml contenant du verre broyé stérilisé, le mycélium est ensuite broyé en utilisant des micros pillons.

600 µl de la solution de lyse (50 mM Tris-base pH : 7.4, 50 mM EDTA, 1 % SDS, protéinase K : 200 µg/ml) a été ajoutée ; puis le contenu du tube a été homogénéisé par un passage au vortex. Les tubes ont été incubés à 65 °C dans un bain Marie durant 15 mn. Par la suite 2,5 µl (1 mg/1 ml) d'ARNase sont ajoutés au lysat cellulaire, les échantillons ont été mélangés en inversant les tubes, et incubés à 37 °C durant 15mn. La solution de précipitation des protéines (Acétate de sodium 3 M) a été ajoutée au lysat à raison de 200 µl par tube, ces derniers ont été mélangés avec un vortex durant 20 secondes, puis centrifugés durant 10 mn à 13000g.

Après la centrifugation, le surnageant est récupéré dans un nouveau tube de 2 ml, et un volume égal d'une solution de chloroforme a été ajouté. Le contenu des tubes est homogénéisé par inversion des tubes. Après une centrifugation à 13000g pendant 10 mn, le surnageant est pipeté délicatement pour éviter de récupérer les protéines, et transféré dans un nouveau tube de 1,5 ml. La précipitation de l'ADN, son lavage, son séchage puis sa dilution dans la solution TE, ont été réalisés tel que décrit au chapitre **III.2.6.2**.

## B. Evaluation de la quantité et de la qualité de l'ADN extraite

La quantité d'ADN est déterminée par des lectures de la densité optique (Do) au spectrophotomètre. Pour cela, nous avons préparé une dilution pour chaque échantillon ; 5 µl d'ADN ont été mélangés avec 995 µl de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH : 8) pour un volume total de 1000 µl (1 ml), après agitation, la lecture est réalisée. La qualité de l'ADN est vérifiée tel que décrit dans la section III.2.6.3.

### III.2.7.2. Amplification par PCR des gènes ToxA

Dans le but de détecter le gène de virulence ToxA chez les 214 échantillons d'ADN nous avons utilisé la technique PCR avec un couple d'amorces spécifiques. Les concentrations ont été ajustées à 50 ng/µl. L'ADN extrait à partir de la souche de référence Pti2 qui représente la race 1 a été utilisé comme témoin positif pour la présence de ToxA, lors de l'évaluation sur le gel d'agarose.

#### A. Mélange réactionnel

Les réactions d'amplification pour la recherche du gène de virulence ToxA, ont été réalisées dans un volume réactionnel de 25 µl, le protocole adopté pour chaque réaction est indiqué dans le tableau VIII.

Pratiquement, le mélange réactionnel pour l'ensemble des échantillons est préparé dans un tube à part puis réparti à raison de 24 µl pour chaque tube. Les ADN utilisés sont au préalable préparés à raison de 1 µl dans des tubes pour PCR de 250 µl, de même que 1 µl d'eau distillée stérile a fait office de témoin négatif.

**Tableau VIII :** Mélange réactionnel utilisé lors des amplifications des gènes pour chaque échantillon.

Composant	Volume (µl)	Concentration
Eau	12,5	/
Tampon (X5)	5	X1
dntp (10mM) (A, G, C, T)	2,5	0,25 mM
Amorce R (10µM)	1,5	0,5 mM
Amorce F (10µM)	1,5	0,5 mM
Taq polymérase	1	1 U
ADN	1	50 ng/µl

## **B. Amorces utilisées**

Le couple d'amorces TA51F (5'-CGTTCTATCCTCGTACTTC-3') et TA52R (5'-GCATTCTCCAATTTTCACG-3') a été utilisé pour amplifier le gène ToxA. L'amplifiant correspond à une séquence de 573pb égal à presque la totalité de la région codante (Andrie *et al.*, 2007).

## **C. Programme d'amplification**

Les amplifications ont été réalisées avec le Thermocycleur Biometra (Montréal Biotech) en suivant le programme décrit par Andrie *et al.* (2007), et modifié par Benslimane (2018). Celui-ci correspond à une dénaturation de 1 minute à 94 °C, suivie de 34 cycles comportant les étapes suivantes : 45 secondes de dénaturation à 94 °C, 30 secondes à 58 °C pour la phase d'hybridation, et enfin 1 minute d'élongation à 72 °C. Les amplifications sont terminées par un traitement de 7 minutes à 72 °C pour l'élongation finale.

## **D. Visualisation des produits PCR**

Les fragments amplifiés ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% dans un tampon TAE (2 M Tris-base, 1 M Acide acétique, 0.5 M EDTA, pH : 8).

A cet effet, nous avons déposé 10 µl de produit PCR, mélangé avec 5 µl de tampon de charge (Glycérol : 2 ml ; Bleu de bromophénol : 0,01 g ; eau distillée : 3 ml), dans chaque puits. Le dernier puit est réservé au marqueur de poids moléculaire, dans lequel nous avons déposé 3 µl de ce dernier. La migration est effectuée dans un tampon TAE (1X) sous un courant de 90 Volts, jusqu'à ce que le front de migration arrive à 1cm de l'extrémité du gel. Le Bromure d'Ethidium incorporé au gel d'agarose lors de sa préparation, permet de visualiser sous lumière UV (Ultraviolette) les fragments amplifiés.

### **III.2.7.3. Séquençage des produits d'amplification**

Afin de vérifier la présence possible de variations chez le gène ToxA, un séquençage de la totalité du gène a été réalisé chez des isolats ayant montré sa présence. A cet effet, 25 isolats ont été choisis de façon aléatoire ; 22 isolés collectés en Algérie (Ptr 1, Ptr 52, Ptr 56, Ptr 61, Ptr 63, Ptr 72, Ptr 76, Ptr 78, Ptr 16.1.1, Ptr 16.1.2, Ptr 16.2.1, Ptr 16.2.2, Ptr 16.3.1, Ptr 16.3.2, Ptr 16.5.1, Ptr 16.5.3, Ptr 16.25.2, I 7.8, 7.9, 16.2, 16.5, 16.7), 2 collectés en Syrie (82.5, 82.6), et 1 collecté en Tunisie (Ptr TN 1.6).

Le séquençage des deux brins « sens » et « anti-sens » a été effectué ; il a été réalisé au « Centre for Crop and Disease Management », Department of Environment and Agriculture, Curtin University, Australia.

#### **III.2.7.4. Analyses des séquences obtenues**

La qualité des séquences extraites sous format FASTA à partir des chromatogrammes, a été vérifiée par le logiciel Chromas version 2.6.5. La séquence de référence correspondante du gène ToxA a été obtenue à partir des banques génomiques de NCBI. Après l'obtention des compléments de l'inverse des séquences anti-sens moyennant le programme « DNA Sequence Reverse Complement Tool », un alignement multiple a été réalisé sur la totalité des séquences des brins codants, des brins anti-sens et celle de référence, en utilisant le programme Jalview, version 2.11.1.4 (Waterhouse *et al.*, 2009).

Après avoir détecté un haplotype différent chez 2 isolats suite à une variation observée, une rétrospective permettant de réunir les haplotypes de ToxA connus, a été réalisée. Ces haplotypes ont été décrits chez *P. tritici-repentis*, ou chez d'autres espèces apparentées. Un alignement des séquences a été alors réalisé, et ce afin de comparer l'haplotype identifié chez ces deux isolats aux autres déjà connus.

#### **III.2.8. Identification du type de races des isolats ayant montré une variation de ToxA**

Les 2 isolats I7.9 et I7.8, dont la séquence de ToxA a présenté une variation, ont fait l'objet d'une étude de détermination des races ; pour cela une gamme différentielle composée de cinq génotypes de blé a été inoculée.

##### **III.2.8.1. Préparation des plants**

La gamme d'hôte différentielle utilisée est composée des 4 génotypes de blé tendre composants la gamme différentielle standard ; Glenlea, 6B365, 6B662 et Salamouni (Lamari et Bernier, 1989c), auxquels a été ajouté le cultivar Coulter. Ce dernier a été utilisé en raison de la réaction différentielle qu'il a montré à l'égard de certains isolats algériens (Benslimane *et al.*, 2011).

Cinq à six graines de chacun des génotypes, ont été plantées dans des terrines (30x30x15 cm) contenant 1/3 de terre, 1/3 de sable et 1/3 de terreau. Les différents composants ont été stérilisés au préalable. Dans chaque terrine, le lit de semi a été partagé en cinq parties, permettant de recevoir les graines des 5 génotypes ; 3 répétitions ont été ainsi préparées pour chaque isolat

inoculé. Les semis ont été maintenus dans une chambre de croissance à une température environ 18 °C (nuit) et 20 °C (jour) avec une photopériode de 18 h. Les plants ont été arrosés selon les besoins. Après la levée, trois plants par génotype, ont été conservés pour l'inoculation.

### **III.2.8.2. Préparation de l'inoculum**

Les conidies ont été produites sur V8-PDA comme décrit par Lamari et Bernier (1989c), tel que rapporté dans le chapitre **II.2.5.1**.

Les conidies formées sont récoltées en frottant délicatement la colonie avec la boucle d'une anse d'ensemencement bactérienne. La colonie est recouverte au préalable avec de l'eau distillée stérile. Les spores sont récupérées grâce au rinçage de la colonie avec de l'eau distillée stérile. Lors de la préparation de l'inoculum, les solutions de spores contenues dans des Erlenmeyers, sont maintenues dans un bac à glace, afin d'inhiber la germination des spores jusqu'au moment de l'inoculation. La concentration des suspensions de spores ont été ajustées avec de l'eau distillée stérile à 3500 spores/ml. Enfin, du Tween®20 (Monolaurate de Polyoxyéthylène Sorbitol) a été ajouté, à raison d'une goutte par 100 ml de suspension.

### **III.2.8.3. Inoculation**

L'inoculation a été réalisée au stade deux feuilles. Les plantules de blé ont été inoculées avec la suspension de spores jusqu'au ruissellement, en utilisant un pulvérisateur manuel. Après l'inoculation, ces plantules ont été placées sous conditions d'humidité continue pendant 24 heures à environ 20 °C et une photopériode de 18 h lumière.

L'humidité continue est assurée par le maintien des terrines dans des sacs en plastiques transparents fermés, dans lesquels de l'air a été introduit, et dont le fond a été remplis d'eau. L'eau a été également pulvérisée à l'intérieur, sur les parois des sacs, à des périodes régulières. Un thermomètre a été installé dans la chambre de culture pour contrôler la température.

Les plants ont été évalués pour leur réaction à la maladie après 6 jours d'inoculation en utilisant un système de classification des races basé sur le profil de virulence, développé par Lamari *et al.* (1995), auquel la variété Coulter a été ajoutée tel recommandé par Benslimane *et al.* (2011) (Tableau II).

### **III.2.9. Analyse de la réaction de la variété Glenlea aux filtrats de culture des isolats ayant montré une variation du gène ToxA**

Afin de vérifier l'impact de la variation retrouvée sur l'expression et l'activité de la toxine Ptr ToxA, les filtrats de culture des isolats I7.9 et I7.8, ont été testés sur les feuilles de la variété Glenlea. La variété Glenlea a été choisie en raison de sa réaction de sensibilité connue (nécrose) à l'égard de la race 1 (Lamari et Bernier, 1989b, c) ce qui indique la présence du gène de sensibilité *Tsn1* (Faris *et al.*, 1996 ; Stock *et al.*, 1996).

#### **III.2.9.1. Préparation des filtrats de culture**

Les filtrats de culture ont été produits suite à la culture des deux isolats, dans un milieu Fries (Tomas et Bockus, 1987), dont la composition pour 1 litre d'eau distillée stérile est la suivante :

NH <sub>4</sub> Tartrate d'ammonium	5 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> Nitrate d'ammonium	1 g
M gSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O Sulfate de Magnésium Hydraté	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Potassium phosphate monobasique	1,3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Potassium phosphate dibasique	2,6 g
Sucrose	30 g
Extrait de levure	1 g

Cette composition est additionnée de 2 ml d'une solution d'éléments minéraux composée de :

CuCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O Chloride de cuivre	80 mg
H <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub> Acide Molybdique	34 mg
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O Chloride de Manganèse	72 mg
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O Chloride de Calcium	07 mg
H <sub>2</sub> O	1000 ml

A cet effet 3 à 5 disques de 6 mm de diamètre prélevés à partir d'une culture sur milieu V8-PDA, ont été transférés dans des Erlenmeyer de 250 ml contenant 40 ml de milieu Fries. Trois répétitions ont été préparées pour chacun des deux isolats, de même que pour l'isolat Pti2 (souche de référence pour la race 1). Le filtrat de culture de la souche de référence a été utilisé comme témoin positif, alors que trois flacon non inoculés, contenant que le milieu Fris ont été utilisés comme témoin négatif. Les flacons d'Erlenmeyer ont été incubés à l'obscurité pendant 21 jours à 20 °C. Après cela, les cultures ont été filtrées avec du papier Whatman 1 (Cat No 1001

090), puis avec un filtre Millipore de 0,2 µm. Les filtrats de culture ont été conservés à -18 °C jusqu'à leur utilisation.

### **III.2.9.2. Infiltration des feuilles de blé**

Les Plants préparés comme décrit précédemment (chapitre **III.2.8.1**), ont été infiltré au stade deux feuilles. La deuxième feuille au niveau de 3 plants, ont été infiltrées individuellement avec 20 µl de chacun des 3 filtrats de culture. Le milieu de culture Fries, incubé dans les mêmes conditions que les cultures fongiques, a été également infiltré de la même façon à un même nombre de feuilles, il représente le témoin négatif. La zone foliaire infiltrée était marquée avec un marqueur noir permanent non toxique, pour faciliter sa distinction pendant l'évaluation de la réaction. La réaction des feuilles infiltrées ont été évaluées après 7 jours, pour noter la présence/absence de nécrose au niveau de la zone infiltrée.

### **III.2.10. Recherche des sources de résistance à l'égard de la race 1 et de la race 5 de *P. tritici-repentis* par inoculation artificielle**

Afin de rechercher des sources de résistance à l'égard des deux races ; races 1 et race 5, 116 génotypes de blé fournis par l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA) (Annexe 2), ont été évalués, pour leur réaction aux deux races, en conditions contrôlés. Les génotypes résistants ont été réévalués une seconde fois, dans un deuxième essai dans les même conditions ; et ce pour la confirmation de leur résistance à la maladie. Enfin, ces génotypes résistants ont été sélectionnés pour un essai en plein champ.

#### **III.2.10.1. Evaluation de la réaction à la maladie sous conditions contrôlées**

Les plants de blé ont été préparés et maintenus dans les conditions décrites précédemment (**III.2.8.1**). Cinq à six graines de chaque génotype ont été plantées dans un pot et placées dans la chambre de croissance pendant 12 jours. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque génotype.

La préparation de l'inoculum des deux isolats des deux races 1 et 5 a été réalisée selon la même méthode décrite précédemment (chapitre **III.2.5.1** et **III.2.8.2**). L'inoculation a été réalisée selon la même méthode décrite précédemment (**III.2.8.3**). En raison des limites de l'espace disponible dans la chambre de culture, les génotypes ont été divisés en lots de 25 à 30 génotypes par inoculation (75 à 90 pots/isolat/inoculation).



La réaction de la plante a été notée après 6 jours, selon une échelle de 1 à 5 rapportée par Lamari et Bernier (1989c). Cette échelle est basée sur le type de lésions observées sur la plante (Tableau IX).

**Tableau IX :** Echelle d'évaluation des réactions du blé à l'égard du *P. tritici-rpentis*.

Score	Type de symptômes	Type de réaction
1	Petites taches marron foncées à noir Aucun halo jaunâtre	Résistant = <b>R</b>
2	Petites taches marron foncée à noir très peu de chlorose ou nécrose foncée	Modérément Résistant = <b>MR</b>
3	Petites taches marron foncé à noir entourées de halo chlorotique ou nécrotique distincte Les lésions ne coalisent pas	Modérément Résistant à Modérément Sensible = <b>MR/MS</b>
4	petites taches marron foncé à noir entourées de halo chlorotique ou nécrotique distincte Les lésions coalisent	Modérément Sensible = <b>MS</b>
5	Les petites taches marron foncé à noir peuvent ou pas être visibles. La majorité des lésions se réunissent en une seule zone chlorotique ou nécrotique.	Sensible = <b>S</b>

### III.2.10.2. Essai de confirmation des réactions de résistance

Les géotypes qui se sont avérés résistants à la tache auréolée, ont été inoculés et évalués pour une deuxième fois dans les mêmes conditions décrites précédemment. Ces géotypes sont ceux dont la réaction a été évaluée à un score de 1 (résistant) ou 2 (modérément résistant). Ainsi, pour la première réaction (score 1) : 7 géotypes à l'égard de la race 1 et 12 géotypes à l'égard de la race 5. De même que pour la seconde réaction (score 2) : 6 géotypes à l'égard de la race 1 et 8 géotypes à l'égard de la race 5, ont été réévalués. Soit un total de 33 géotypes.

### III.2.10.3. Evaluation de la réaction à la maladie en plein champs

Les géotypes révélés résistants lors des essais précédents ont été évalués en plein champ, à la station expérimentale de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA), durant la saison agricole 2018-2019. Deux essais séparés ont été réalisés ; le premier a réuni 7 géotypes sélectionnés résistants à l'égard de la race 1, et le second 13 géotypes résistants à l'égard de la race 5 (Tableau X).

**Tableau X :** Génotypes de blé évalués en plein champs.

	<b>Génotype</b>	<b>Pédigrée</b>	<b>Espèce</b>	<b>Origine</b>
<b>Génotypes évalués pour la réaction à l'égard de la race 1</b>	BD 5	ICD99-0027-C-0AP-14AP-AP-9AP-AP	BD	Algérie/ICARDA
	<i>T. POLONICUM</i> x <i>Z. Bouteille</i>	Sélection dans la population locale	BD	Algérie
	SIGUS	Ter-1/3/Stj3//Bcr/Lks4ICD1036-T-0AP-9AP-AP-5AP-AP	BD	Algérie/ ICARDA
	TELL 76		BD	Algérie
	CIRTA	HEDBA-03 / GDO VZ 619	BD	Algérie
	Beltagy-3	ICD97-0396-T-1AP-AP-5AP-0AP-16AP-AP	BD	ICARDA
	Miki 3	ICD94-0994-C-10AP-0AP-2AP-0AP-9AP-0TR	BD	Algeria
<b>Génotypes évalués pour la réaction à l'égard de la race 5</b>	BD 3	Mgnl3/Aghrass2ICD99-0015-C-9AP-AP-21AP-AP	BD	Algérie/ICARDA
		CDSS06Y00816T-0TOPB-61Y-0M-8Y-1M-0Y	BD	Algérie/CIMMYT
		CDSS07Y00046S-099Y-099M-18Y-2M-04Y-0B	BD	Algérie/CIMMYT
	OUED ZENATI 368	Sélection dans la population locale	BD	Algérie/CIMMYT
	BELIOUNI	Sélection dans la population locale	BD	Algérie/CIMMYT
	CIRTA	Hedba3/GDO VZ 619	BD	ITGC/ Algérie
	SIGUS	Ter-1/3/Stj3//Bcr/Lks4ICD1036-T-0AP-9AP-AP-5AP-AP	BD	ICARDA/Algérie
	SIMETO	Capeiti x Valvona	BD	IEC (Italie)
	Ofonto	Adamello x Appulo	BD	IEC (Italie)
	CAPEITI 8		BD	Italie
	HOGGAR	JO''S''/AA''S''//fg''S''CM 9799CM 9799	BD	Algérie/ CIMMYT
		Miki 3	ICD94-0994-C-10AP-0AP-2AP-0AP-9AP-0TR	BD
	ADJINI	Variété locale	BD	Algérie

## A. Installation des essais

Le semis a été réalisé durant la campagne agricole 2018/2019, au niveau de la station expérimentale de l'ENSA. Le précédent cultural est une jachère, sinn, la parcelle est utilisée chaque année pour des essais sur les cultures céréalière, notamment le blé. Chaque essai a été effectué selon un protocole expérimental en Criss-Cross (Fig. 9). Chaque essai a été réalisé avec trois blocs séparés d'un mètre chacun, et chaque bloc est subdivisé en deux sous-blocs.

Le bloc est subdivisé en deux sous blocs, permettant d'inoculer une partie de la micro-parcelle et de traiter la seconde partie par un fongicide. Cette subdivision est concrétisée lors des traitements, par l'installation d'un film plastique d'une hauteur de 1,5 m au centre de la micro-parcelle, qui la partage en deux sous micro-parcelles. Au niveau de chacune des micro-parcelles, ont été installées 8 lignes de semis séparées l'une de l'autre par une distance de 20 cm. Le semi a été réalisé manuellement à raison de 25 graines par ligne (Fig. 9).

Des désherbages manuels ont été effectués lorsqu'il a été nécessaire au cours de l'essai. Une fertilisation a été apportée deux fois, suivant les besoins de la culture par l'utilisation de l'engrais NPK sous la formule 15-15-15. La première, le jour du semis (mois de Décembre) et la seconde au stade tallage (mois de Février).

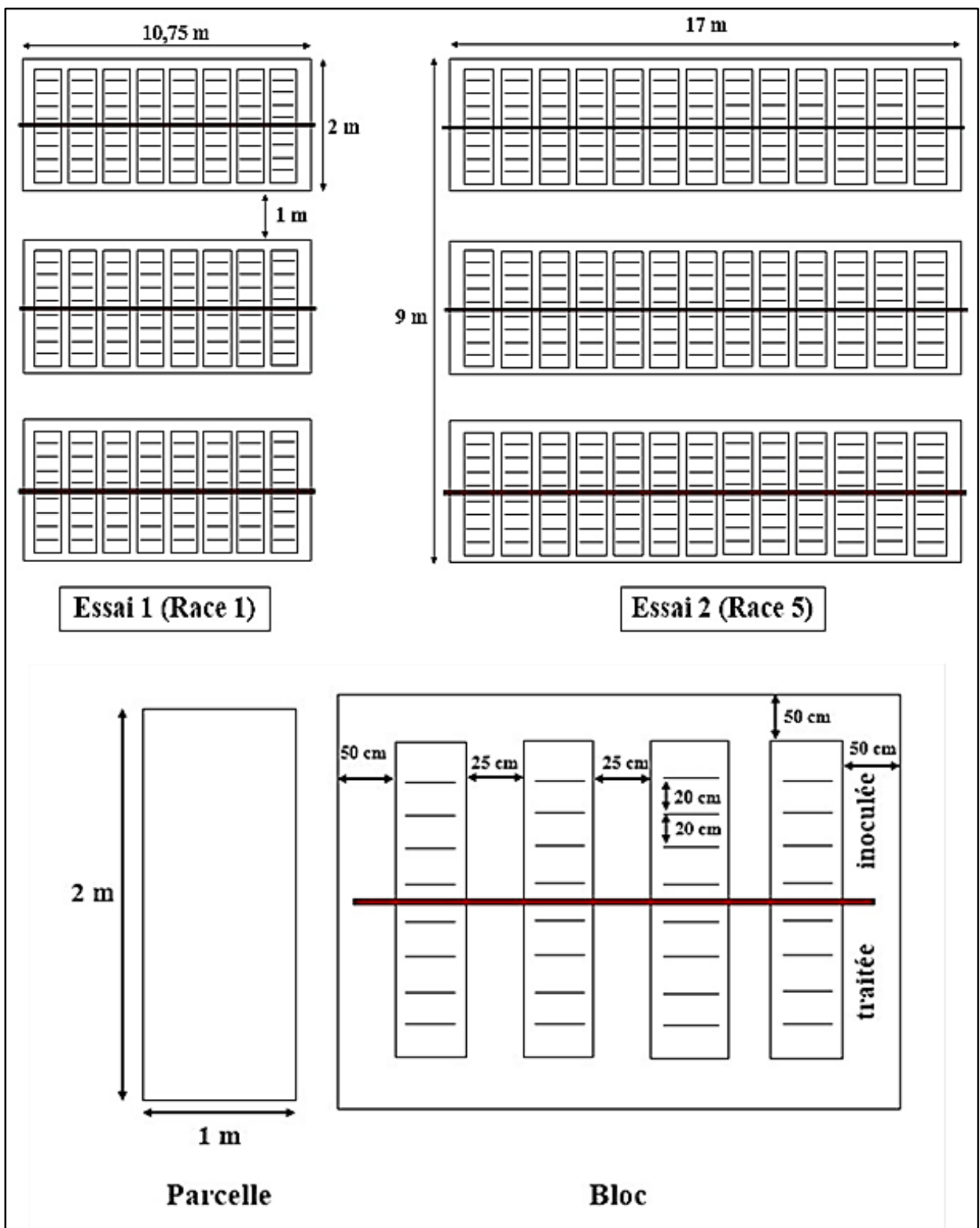
## B. Traitements fongicides préventifs

Les traitements fongicides utilisés ont été effectués selon la dose prescrite par le fabricant et cela pour les deux essais. Deux traitements ont été réalisés, moyennant deux produits ; OPUS appliqué au stade fin tallage-début montaison à dose de 0.8 l/ha, et PROSARO appliqué au stade épiaison à la dose de 0.8 l/ha (Tableau XI). Seule une des deux sous micro-parcelle préparée pour chaque génotype a été traitée, ce qui fait une dose de 0,8 ml pour chaque sous micro-parcelle.

**Tableau XI** : Caractéristiques des fongicides utilisés.

Non commercial	Matière active	Formulation	Composition	DAR*
<b>OPUS</b>	Epoxiconazole, fongicide de synthèse, famille des triazoles	suspension concentrée	125 g/l d'époxiconazole	28 jours
<b>PROSARO</b>	Prothioconazole, famille des triazolinthione, et tébuconazole famille des triazoles	concentré émulsionnable	125 g/l de prothioconazole, 125 g/l de tébuconazole	35 jours

\* durée avant rémanence



**Figure 9 :** Dispositif expérimental en Criss-Cross. Le bloc est subdivisé en deux sous-blocs. Le bloc est subdivisé en un nombre de micro-parcelles équivalent au nombre de génotypes évalués, chacune d'elle a une superficie de 2 m<sup>2</sup> (2 m X 1 m), espacées de 25 cm. Soit, 8 micro-parcelles pour le premier essai (Race 1) et 14 pour le second (Race 5), dans lesquels les différents génotypes ont été affectés aléatoirement.

### C. Préparation de l'inoculum et inoculation

L'inoculum a été préparé selon la méthode de Lamari et Bernier (1989c), utilisée lors de l'évaluation de la réaction en conditions contrôlées (Tableau X). Les suspensions des spores ont été ajustées avec de l'eau distillée stérile à une concentration de 4000 spores/ml, dans un pulvérisateur manuelle de 10 L.

Une irrigation de la parcelle expérimentale par aspersion a été réalisée avant l'inoculation afin d'assurer une humidité relative très élevée. L'inoculation des sous micro-parcelles non traitées par les fongicides, a été réalisée en fin de journée au stade plein tallage-début montaison (Fig. 10) par pulvérisation de la suspension de spores de *P. tritici-repentis*. Un plastique couvrant toutes les parcelles a été installé suite à l'inoculation, afin de garder une humidité élevée durant 24 h, nécessaire à l'infection.



**Figure 10 :** Essai en plein champ montrant le stade phonologique de la plante (plein tallage-début montaison), lors de l'inoculation.

### D. Evaluation de la réaction des génotypes inoculés à la maladie

La réaction des plantes a été évaluée à 10 (30 Mars), 20 (10 Avril), 30 (20 Avril), et 40 jours (01 Mai) après l'inoculation, par deux méthodes : (i) l'échelle de 1 à 5 développée par Lamari et Bernier (1989c), comme décrit précédemment ; les scores de 0-2 sont considérés comme résistants et de 3-5 sont considérés comme sensibles. (ii) l'estimation du pourcentage de la surface foliaire couverte par les symptômes sur l'ensemble des feuilles, ainsi que sur l'ensemble des plants inoculés (0 à 100 %).

---

## **IV- Résultats Et Discussion**

---

#### IV.1. Prospection et construction de la collection

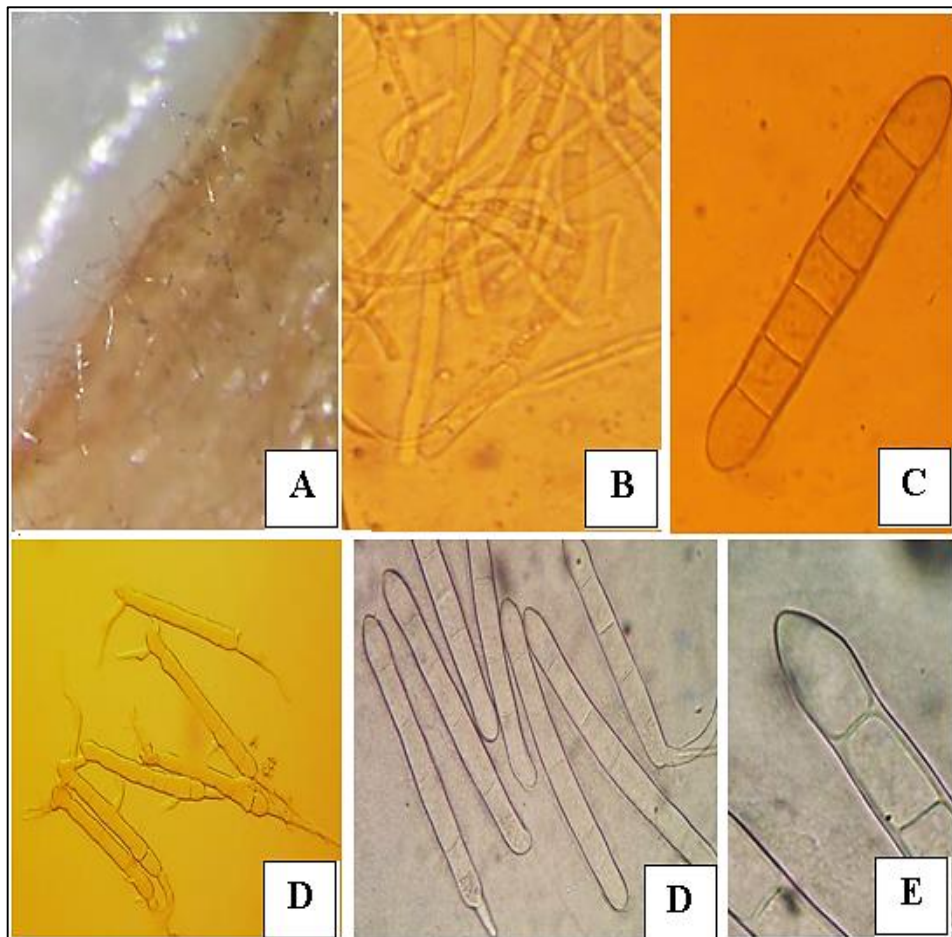
Les prospections réalisées dans 7 wilayas durant les deux campagnes céréalières 2014/15 et 2015/16 à travers différentes régions céréalières du pays, ont confirmé la présence de la tache auréolée du blé dans toutes les régions prospectées. Celles-ci sont : Alger, Blida, Médéa, Sétif, Béjaïa, Constantine et Ain Defla. Le diagnostic a concerné aussi bien les cultures de blé dur que celles de blé tendre, il a été basé sur l'observation du symptôme typique du Tan Spot, caractérisé par une nécrose de forme ovale et entourée d'une chlorose régulière. Cela a permis la collecte de 26 échantillons au niveau de 15 localités dans les 7 Wilayas. Par ailleurs, 10 échantillons ont été collectés dans les champs tunisiens, et nous ont été fournis par Pr. Nasraoui B., INAT, Tunisie.

Les symptômes observés sur les champs infectés, sont dans la plupart des cas des nécroses ovales, régulièrement entourées d'une chlorose, il s'agit en effet des symptômes typiques du Tan Spot. Parfois et quand l'attaque est sévère, les taches ovales sont collées les unes aux autres. Des spores de l'agent causal ont été parfois observées sur les échantillons sous une loupe binoculaire.

La tache auréolée du blé, était présente aussi bien sur les cultures de blé dur que celles de blé tendre ; plusieurs variétés ont été touchées par ce pathogène dans les champs visités à savoir, Hidab (Blé tendre), Vitron, Waha et Chen's (blés dur). Les variétés communément cultivées à savoir, Hidab et Vitron paraissent particulièrement sensibles à ce champignon ; durant les deux campagnes agricoles, où nos prospections se sont déroulées.

Les isolements effectués suite à l'incubation des fragments de feuilles infectées en chambre humide, ont permis d'observer la formation de fructifications au niveau des lésions (Fig. 11.A), et de confirmer l'identification du champignon.

L'observation sous une loupe binoculaire a permis de constater la présence de conidiophores relativement longs, non ramifiés, segmentés et de couleur marron foncé (Fig. 11.B), et des conidies cylindrique (Fig. 11.C) pouvant germer à partir de n'importe quelles cellules, qu'elles soient apicales, basales ou médianes (Fig. 11.D). Elles mesuraient entre 116 et 217  $\mu\text{m}$  de longueur et entre 15 et 18  $\mu\text{m}$  de largeur, de même qu'elles possédaient un nombre de cloisons compris entre 5 et 11. La forme de la cellule apicale était très typique, caractérisée par une forme conique (forme en tête de serpent) (Fig. 11.E). Lors de la germination de la conidie, il a été possible d'observer un tube germinatif de croissance latérale. Cette description correspond à l'espèce *Drechslera tritici-repentis* (Anamorphe de *Pyrenophora tritici-repentis*) rapportée par Gaur *et al.* (2006), Hunger et Brown (1987), Ellis (1976) et Shoemaker (1962).



**Figure 11 :** Isolement et identification de l'agent pathogène *P. tritici-repentis*. Sous loupe binoculaire : **A** : Fructifications au niveau des lésions sur les fragments de feuilles. Sous microscope optique : **B** : Conidiophores formés sur les fragments de feuilles ; **C** : Aspect des conidies formées ; **D** : Aspect de la germination des conidies ; **E** : Cellule apicale de la conidie en forme de tête de serpent.

Après l'isolement monospore, 87 isolats algériens et 10 isolats tunisiens ont été obtenus (Annexe 1).

Tous les isolats de la nouvelle collection (97 isolats de 2015 et 2016) ont été repiqué sur milieu V8-PDA, puis conservés par la méthode des disques séchés, dans des tubes de 2 ml à -18 °C jusqu'à leur utilisation.

Les prospections réalisées dans les différentes régions céréalières durant les deux campagnes céréalières 2014/2015 et 2015/2016, ont confirmé l'importante présence de la tache auréolée du blé en Algérie. La maladie a été détectée dans toutes les wilayas prospectées appartenant aux étages bioclimatiques humide et subhumide de l'est et du centre du pays, où les conditions climatiques y sont favorables. Cette maladie exige un climat doux et humide, elle semble principalement confinée dans le nord-est et le centre du pays.



Par ailleurs, durant les prospections réalisées à travers les régions céréalières, il a été remarqué sur les cultures de blé la présence d'autres agents pathogènes tels que *Pyrenophora teres* (Anamorphe = *Drechslera teres*) (Fig. 12). Ce dernier présente des symptômes qui peuvent prêter à confusion avec ceux induits par le *P. tritici-repentis*.



**Figure 12 :** Feuille de blé infectée par *Pyrenophora teres*.

Le diagnostic a été confirmé au laboratoire grâce aux isolements et l'observation des fructifications, qui correspondaient à ceux rapportées par Zillinsky (1983). L'espèce *Pyrenophora teres* Drechs. (Anamorphe = *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem.), a ainsi été identifiée grâce aux caractéristiques des conidies ; celles-ci sont de couleur marron clair, de forme droite, cylindrique et arrondie aux deux extrémités. Elles mesurent entre 50,64 et 75,96  $\mu\text{m}$  de longueur et entre 11,51 et 13,81  $\mu\text{m}$  de largeur ; chacune des conidies pouvait avoir entre 4 et 6 cloisons (Fig. 13). Sur milieu PDA, la colonie présente une couleur verte et forme des corémies ; ce dernier caractère est très spécifique du *P. teres* (Fig. 13).



**Figure 13 :** Aspects cultureux des colonies et conidies de *Pyrenophora teres* sur milieu PDA (anamorphe = *Drechslera teres*).

## IV.2. Caractérisation morphologique des isolats

Après l'isolement, les conidies ont été transférées individuellement sur milieu PDA et incubées à l'obscurité pendant une semaine. Sur milieu PDA, les colonies obtenues présentent un mycélium soit épais cotonneux souvent blanc (Fig. 14.A), soit très cotonneux généralement blanc (Fig. 14.B), parfois pelucheux de couleur souvent vert-gris (Fig. 14.C). Il a été remarqué dans la plus part des boites la production dans le milieu d'un pigment vert (Fig. 14.D). Le vieillissement d'une colonie est caractérisé par l'apparition d'agrégations constituées de mycélium de forme sphérique, et de couleur noir (Fig. 14.E). Par ailleurs, l'apparition de colonies de couleur orange a été parfois observée durant nos travaux (Fig. 14.F). Ce phénomène est accompagné par une perte de la capacité de sporulation chez l'isolat, il résulte d'un repiquage répété.

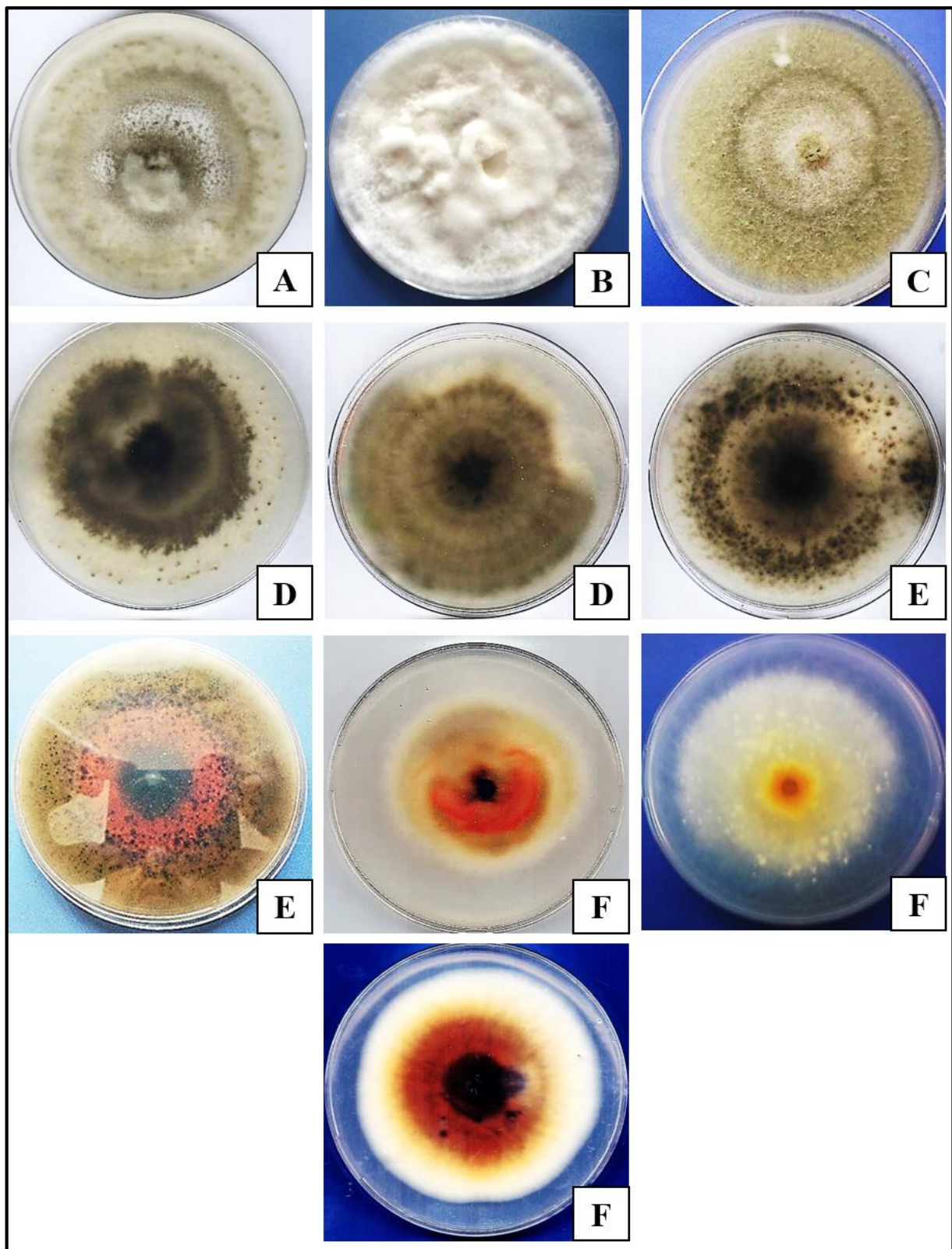
## IV.3. Etude de la croissance mycélienne des isolats

L'effet de la température à 25 °C sur la croissance mycélienne des 93 isolats (algériens et tunisiens) de *P. tritici-repentis* a été étudié sur milieu PDA. Les moyennes de la croissance radiale journalière sont indiquées dans le tableau XII, la Figure 15 et l'annexe 11.

L'analyse des résultats relatifs à la croissance radiale des isolats, a confirmé la croissance de *P. tritici-repentis in-vitro* sous cette température (25 °C), avec parfois de grandes variations entre les différents isolats. La croissance totale enregistrée au bout du 6 jours, est en moyenne de 7,62 cm.

En considérant la moyenne de la croissance journalière chez l'ensemble des isolats, nous constatons un maximum de 6,75 mm/jours enregistré chez l'isolat Ptr 16.25.3 provenant de Constantine, et un minimum de 3,67 mm/jours enregistré chez l'isolat Ptr 16.11.2 provenant de Sétif.

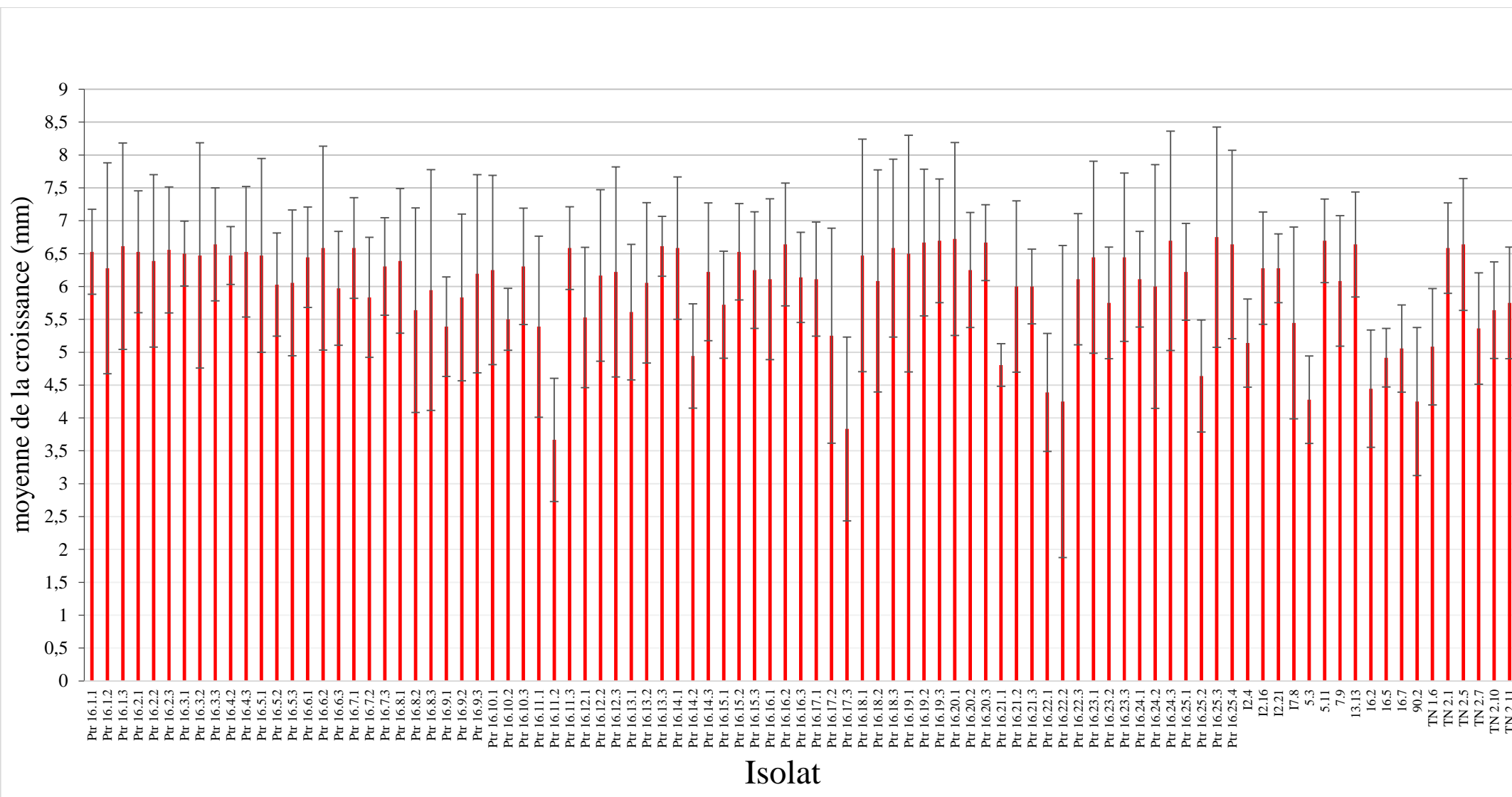
La plus faible croissance mycélienne a été enregistrée chez l'isolat Ptr 16.17.3 provenant de Béjaïa, avec un diamètre de la colonie ne dépassant pas les 4,87 cm au bout du 6<sup>ème</sup> jour de croissance. En revanche, 42 isolats de *P. tritici-repentis*, ont tous atteint le diamètre de croissance mycélienne le plus important (8,4 cm), avec un recouvrement total de la boîte de Pétri par le mycélium, après seulement 6 jours d'incubation. Parmi ces isolats, 3 provenaient d'Ain Defla, 9 provenaient de Béjaïa, 1 de Sétif, 3 de Blida, 1 de Médéa, 3 d'Alger, 2 de Constantine, et enfin 2 isolats de Tunisie. Ces résultats montrent que, malgré la diversité de leurs origines géographique, ces isolats ont présenté la même vitesse de croissance mycélienne.



**Figure 14 :** Caractères morphologiques des colonies de *P. tritici-repentis* montrant différents aspects cultureux ; **A :** Mycélium épais cotonneux blanc ; **B :** Mycélium très cotonneux généralement blanc ; **C :** Mycélium pelucheux vert-gris ; **D :** Pigmentation de couleur verte ; **E :** Vieillessement de la colonie ; **F :** Couleur orange résultante du repiquage répété.

**Tableau XII :** Moyennes journalières de la croissance radiale en millimètres des 93 isolats à la température de 25 °C.

<b>Isolat</b>	<b>Moyenne (mm)</b>	<b>Isolat</b>	<b>Moyenne (mm)</b>	<b>Isolat</b>	<b>Moyenne (mm)</b>
Ptr 16.1.1	6,53	Ptr 16.11.3	6,58	Ptr 16.22.1	4,39
Ptr 16.1.2	6,28	Ptr 16.12.1	5,53	Ptr 16.22.2	4,25
Ptr 16.1.3	6,61	Ptr 16.12.2	6,17	Ptr 16.22.3	6,11
Ptr 16.2.1	6,53	Ptr 16.12.3	6,22	Ptr 16.23.1	6,44
Ptr 16.2.2	6,39	Ptr 16.13.1	5,61	Ptr 16.23.2	5,75
Ptr 16.2.3	6,56	Ptr 16.13.2	6,06	Ptr 16.23.3	6,44
Ptr 16.3.1	6,50	Ptr 16.13.3	6,61	Ptr 16.24.1	6,11
Ptr 16.3.2	6,47	Ptr 16.14.1	6,58	Ptr 16.24.2	6,00
Ptr 16.3.3	6,64	Ptr 16.14.2	4,94	Ptr 16.24.3	6,69
Ptr 16.4.2	6,47	Ptr 16.14.3	6,22	Ptr 16.25.1	6,22
Ptr 16.4.3	6,53	Ptr 16.15.1	5,72	Ptr 16.25.2	4,64
Ptr 16.5.1	6,47	Ptr 16.15.2	6,53	Ptr 16.25.3	6,75
Ptr 16.5.2	6,03	Ptr 16.15.3	6,25	Ptr 16.25.4	6,64
Ptr 16.5.3	6,06	Ptr 16.16.1	6,11	I2.4	5,14
Ptr 16.6.1	6,44	Ptr 16.16.2	6,64	I2.16	6,28
Ptr 16.6.2	6,58	Ptr 16.16.3	6,14	I2.21	6,28
Ptr 16.6.3	5,97	Ptr 16.17.1	6,11	I7.8	5,44
Ptr 16.7.1	6,58	Ptr 16.17.2	5,25	5.3	4,28
Ptr 16.7.2	5,83	Ptr 16.17.3	3,83	5.11	6,69
Ptr 16.7.3	6,31	Ptr 16.18.1	6,47	7.9	6,08
Ptr 16.8.1	6,39	Ptr 16.18.2	6,08	13.13	6,64
Ptr 16.8.2	5,64	Ptr 16.18.3	6,58	16.2	4,44
Ptr 16.8.3	5,94	Ptr 16.19.1	6,50	16.5	4,92
Ptr 16.9.1	5,39	Ptr 16.19.2	6,67	16.7	5,06
Ptr 16.9.2	5,83	Ptr 16.19.3	6,69	90.2	4,25
Ptr 16.9.3	6,19	Ptr 16.20.1	6,72	TN 1.6	5,08
Ptr 16.10.1	6,25	Ptr 16.20.2	6,25	TN 2.1	6,58
Ptr 16.10.2	5,50	Ptr 16.20.3	6,67	TN 2.5	6,64
Ptr 16.10.3	6,31	Ptr 16.21.1	4,81	TN 2.7	5,36
Ptr 16.11.1	5,39	Ptr 16.21.2	6,00	TN 2.10	5,64
Ptr 16.11.2	3,67	Ptr 16.21.3	6,00	TN 2.11	5,75



**Figure 15 :** Moyennes de la croissance mycélienne radiale journalière chez les 97 Isolats à 25 °C, en obscurité sur milieu PDA.

La comparaison des moyennes journalières des croissances des isolats de *P. tritici-repentis*, a montré que la vitesse de croissance des isolats était plus importante pendant les 5 premiers jours, comparés au 6<sup>ème</sup> jour (Tableau XIII).

**Tableau XIII :** Moyenne  $\pm$  écart type de la croissance mycélienne journalière (mm) pour chacun des 6 jours de mesures.

<b>Jour de mesure</b>	<b>*Croissance (Moyenne <math>\pm</math> ET)</b>
1er jour	5.66 $\pm$ 1.06
2ème jour	6.49 $\pm$ 1.17
3ème jour	6.59 $\pm$ 0.97
4ème jour	6.26 $\pm$ 0.99
5eme jour	5.30 $\pm$ 1.08
6ème jour	4.75 $\pm$ 1.46

\* Croissance moyennes journalière = (croissance évalué le jour J) – (croissance évaluée le jour J-1)

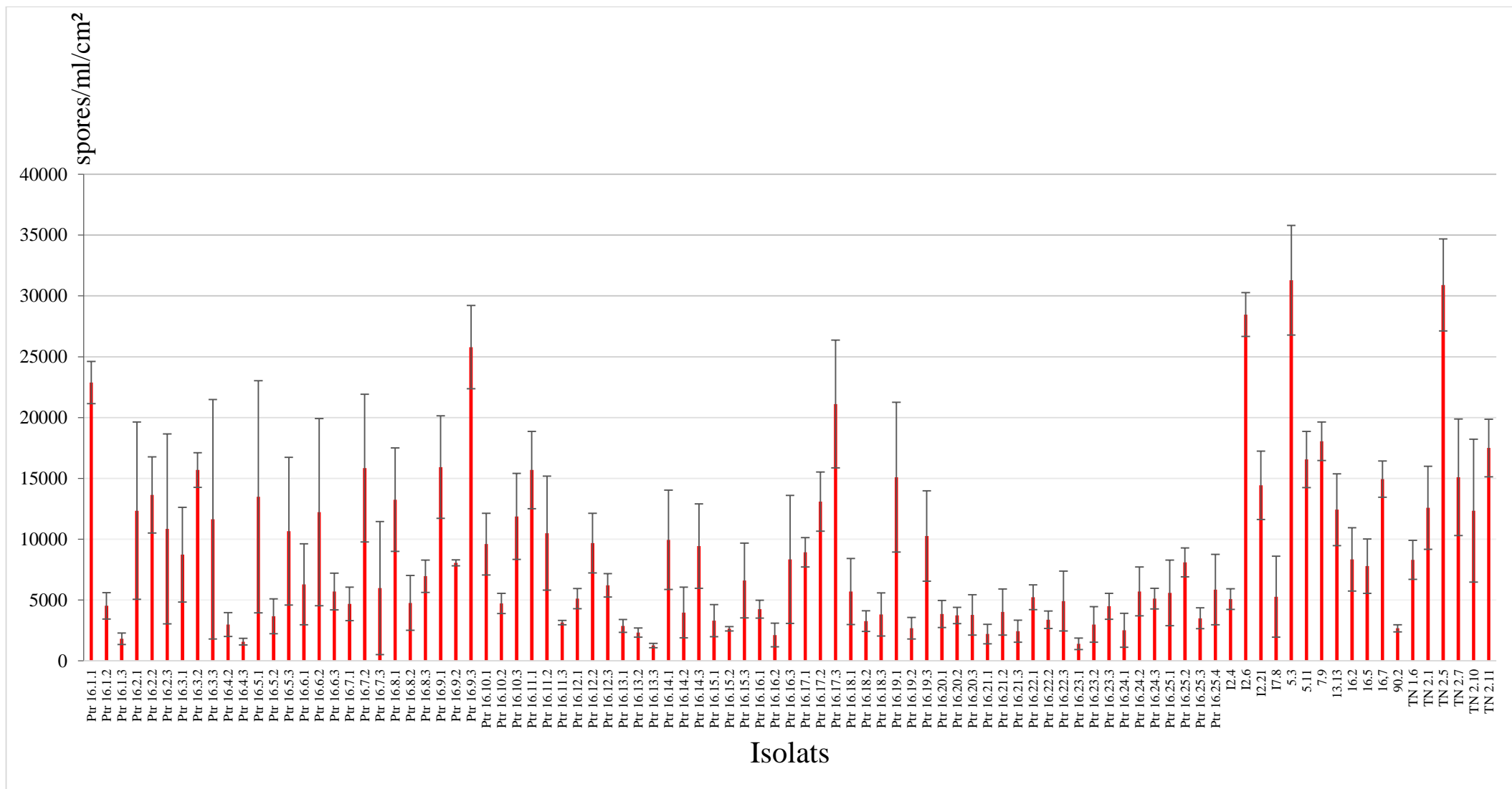
La comparaison des croissances mycéliennes moyennes enregistrées pour les 93 isolats de *P. tritici-repentis* après les 6 jours de mesure, a été réalisée par le test Kruskal-Wallis, qui a mis en évidence une différence très hautement significative entre les isolats ( $P < 0,001$ ) (Annexe 12.1). De même qu’il a révélé une différence très hautement significative entre la croissance des isolats à chaque jour de prise de mesures ( $P < 0,001$ ) (Annexe 12.2).

#### **IV.4. Evaluation du pouvoir de sporulation des isolats *in vitro***

Le pouvoir de la sporulation des 93 isolats (algériens et tunisiens), a été étudié sur milieu V8-PDA. Les moyennes du nombre de spores/cm<sup>2</sup> de culture fongique des 93 isolats, sont indiquées dans le tableau XIV et la Figure 16.

**Tableau XIV :** Pouvoir de sporulation *in vitro* des 93 isolats exprimé par le nombre de spores/cm<sup>2</sup> de culture fongique.

<b>Isolat</b>	<b>Sporulation (spore/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Isolat</b>	<b>Sporulation (spore/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Isolat</b>	<b>Sporulation (spore/cm<sup>2</sup>)</b>
Ptr 16.1.1	22883	Ptr 16.11.3	3145	Ptr 16.22.1	5229
Ptr 16.1.2	4522	Ptr 16.12.1	5111	Ptr 16.22.2	3381
Ptr 16.1.3	1809	Ptr 16.12.2	9672	Ptr 16.22.3	4915
Ptr 16.2.1	12346	Ptr 16.12.3	6212	Ptr 16.23.1	1392
Ptr 16.2.2	13643	Ptr 16.13.1	2870	Ptr 16.23.2	2988
Ptr 16.2.3	10852	Ptr 16.13.2	2320	Ptr 16.23.3	4482
Ptr 16.3.1	8728	Ptr 16.13.3	1258	Ptr 16.24.1	2516
Ptr 16.3.2	15688	Ptr 16.14.1	9947	Ptr 16.24.2	5701
Ptr 16.3.3	11638	Ptr 16.14.2	3971	Ptr 16.24.3	5111
Ptr 16.4.2	2988	Ptr 16.14.3	9436	Ptr 16.25.1	5583
Ptr 16.4.3	1573	Ptr 16.15.1	3303	Ptr 16.25.2	8099
Ptr 16.5.1	13486	Ptr 16.15.2	2634	Ptr 16.25.3	3499
Ptr 16.5.2	3657	Ptr 16.15.3	6605	Ptr 16.25.4	5858
Ptr 16.5.3	10655	Ptr 16.16.1	4246	I2.4	5072
Ptr 16.6.1	6291	Ptr 16.16.2	2123	I2.6	28466
Ptr 16.6.2	12228	Ptr 16.16.3	8335	I2.21	14430
Ptr 16.6.3	5701	Ptr 16.17.1	8925	I7.8	5269
Ptr 16.7.1	4679	Ptr 16.17.2	13093	5.3	31297
Ptr 16.7.2	15845	Ptr 16.17.3	21113	5.11	16553
Ptr 16.7.3	5976	Ptr 16.18.1	5701	7.9	18047
Ptr 16.8.1	13250	Ptr 16.18.2	3263	13.13	12424
Ptr 16.8.2	4757	Ptr 16.18.3	3814	16.2	8335
Ptr 16.8.3	6959	Ptr 16.19.1	15098	16.5	7785
Ptr 16.9.1	15924	Ptr 16.19.2	2674	16,7	14941
Ptr 16.9.2	8060	Ptr 16.19.3	10262	90.2	2674
Ptr 16.9.3	25792	Ptr 16.20.1	3853	TN 1.6	8296
Ptr 16.10.1	9593	Ptr 16.20.2	3735	TN 2.1	12582
Ptr 16.10.2	4718	Ptr 16.20.3	3774	TN 2.5	30904
Ptr 16.10.3	11874	Ptr 16.21.1	2202	TN 2.7	15098
Ptr 16.11.1	15688	Ptr 16.21.2	4010	TN 2.10	12346
Ptr 16.11.2	10498	Ptr 16.21.3	2438	TN 2.11	17496



**Figure 16 :** Comparaison du pouvoir de sporulation des isolats sur milieu V8-PDA (spore/cm<sup>2</sup>).



L'analyse des résultats relatifs au pouvoir de sporulation des 93 isolats, a confirmé que le *P. tritici-repentis* pouvait sporuler abondamment *in-vitro* sur le milieu utilisé ; de grande variation entre les différents isolats ont été remarquées (Annexe 13). En considérant les moyennes des taux de sporulation chez l'ensemble des isolats, un maximum de 31297 spores/cm<sup>2</sup> a été enregistré chez l'isolat 5.3 provenant de Blida. En revanche, un minimum de 1258 spores/cm<sup>2</sup> a été enregistré chez l'isolat Ptr 16.13.3 provenant également de Blida.

L'analyse des résultats du pouvoir de sporulation des 93 isolats de *P. tritici-repentis*, a montré une grande variabilité entre les isolats provenant de différentes régions, mais aussi entre ceux originaires d'une même région. Ceci révèle que l'intensité de sporulation des isolats étudiés, n'est également pas liée à l'origine géographique de ces derniers. La variabilité entre les isolats a été confirmée par l'analyse statistique réalisée par le test Kruskal-Wallis. Les résultats obtenus ont mis en évidence une différence très hautement significative entre les isolats ( $P = 0,000$ ) (Annexe 13.1).

La recherche de corrélations entre les deux paramètres utilisés (le taux de sporulation *in-vitro* et le taux de la croissance), via le test Rho de Spearman a révélé la présence d'une corrélation positive entre ces derniers (Annexe 14).

## **Discussion**

Les critères étudiés pour la caractérisation des isolats, à savoir les caractères culturels des colonies, leur croissance journalière radiale mycélienne, et le pouvoir de sporulation, ont mis en évidence une variabilité morphologique et physiologique chez les isolats de *P. tritici-repentis* collectés en Algérie et en Tunisie. Chez les populations fongiques, la diversité est en effet la norme, tandis que l'uniformité est l'exception (Lilly *et al.*, 1951).

La variabilité morphologique observée dans la collection d'isolats étudiés, pourrait être attribuée aux interactions entre l'information génétique (les isolats d'une même espèce différant les uns des autres dans leur composition génétique), et les conditions environnementales, telles que les différences climatiques et édaphiques dans les zones d'où les isolats ont été obtenus (Poloni *et al.*, 2009).

Nombreux chercheurs ont observé une variation de la couleur et de la morphologie des colonies chez *P. tritici-repentis*, ainsi que chez d'autres populations d'espèces du même genre, collectés dans différentes régions géographiques du monde. Ainsi, Hunger et Brown (1987), Dos Santos *et al.* (2002) et Benslimane (2017) ont étudié les isolats de *P. tritici-repentis*, McDonald (1967) et Frazzon *et al.* (2002) ont étudié des isolats de *P. teres*, et ont observé une variation morphologique significative, basée sur les couleurs des colonies mycéliennes. Des résultats

similaires ont été rapportés par Zaamoum (2007), Benslimane (2002) et Christensen et Graham (1934) lorsqu'ils ont étudié les isolats de *P. graminea*. De même, Boungab (2013) a trouvé une grande variabilité morphologique suite à une étude portée sur 60 isolats de *P. teres* originaires de l'Ouest du pays. Ses résultats ont permis de distinguer quatre morphotypes, et ont montré que cette variabilité n'est pas associée à la diversité géographique des isolats.

Enfin il est à rappeler que Hosford (1971) a observé que les isolats de *P. tritici-repentis* perdaient leur pouvoir de sporulation lorsque la culture devenait de couleur orange, en raison du repiquage fréquent sur milieu PDA. Ces observations ont également été confirmées par Benslimane *et al.* (2017), pour le même champignon, et par Lammari (2021) chez l'espèce apparentée *P. teres*.

La variabilité morphologique a été également trouvée dans plusieurs autres populations de champignons phytopathogènes. Chez un pathogène appartenant à un genre apparenté à celui étudié dans nos travaux, Poloni *et al.* (2009) ont analysé 35 isolats de *Bipolaris sorokiniana* provenant de différents pays (Brésil, Danemark, Bangladesh, Vietnam et Mexique). Les isolats ont montré une grande variabilité morphologique, et ont été regroupés en cinq morphotypes différents. Chez *Mycosphaerella graminicola*, une étude sur 18 isolats provenant de la république tchèque, a montré qu'il y avait une grande variabilité de la morphologie, et la coloration des colonies (Vechet et Vydrova, 2011).

Les caractères morphologiques quantitatifs ont toujours été une partie importante des descriptions des espèces. Ils peuvent, suite à un échantillonnage et une analyse rigoureux, être utilisés pour distinguer entre les espèces appartenantes à un même groupe phylogénétique (Luckow, 1995).

L'étude de la croissance mycélienne des différents isolats de la collection pathogène réunie, a aussi mis en évidence, à travers notamment la diversité observée, des données intéressantes relatives aux potentialités de ce pathogène à se répondre dans nos champs à travers les régions prospectées. De même, que des données utiles à considérer, pour la gestion de la maladie, et l'utilisation des génotypes adéquats en culture. En effet la croissance est une caractéristique importante qui permet au champignon d'utiliser les nutriments des tissus infectés. Loughman et Deverall (1986) ont rapporté lors d'une étude réalisée 3 à 4 jours après l'inoculation, qu'une croissance intercellulaire rapide des hyphes de *P. tritici-repentis* a été observée chez un cultivar de blé sensible, qui a formé une masse de mycélium significativement plus grande, par rapport à la croissance du mycélium formé chez un cultivar résistant.

Conformément aux résultats obtenus dans le présent travail, dans une étude préliminaire menée sur des isolats de *P. tritici-repentis*, Kader *et al.* (2009) ont aussi trouvé des variations importantes de la croissance, et de la sporulation.

Enfin une variabilité du potentiel de sporulation entre les isolats de la collection a été nettement observé ; des données également d'intérêt certain. Le nombre de conidies produites par un isolat est un caractère d'aptitude important dans l'épidémiologie des maladies, (Hunger et Brown, 1987 ; Rodriguez et Bockus, 1996). Les résultats obtenus dans cette étude montrent des localités qui pourraient être à risque épidémiologique variables. Même si nous considérons ces données préliminaires, il serait intéressant d'analyser ce paramètre à l'avenir suivant les règles d'échantillonnage et d'analyse adéquates, permettant les conclusions escomptées. Une variation de la production des conidies chez les isolats de *P. tritici-repentis*, à la fois sur les milieux de cultures, et sur les cultivars de blé, a été aussi rapportée par plusieurs travaux ultérieures (Hunger et Brown, 1987 ; Rodriguez et Bockus, 1996).

Les conidies, produites sur l'hôte, facilitent l'infection secondaire ce qui augmente l'agressivité de la maladie dans les champs (Mundt, 2009). Ceci est d'autant plus vraie dans le cas de la tache auréolée ; il s'agit en effet d'une maladie polycyclique, qui se manifeste de manière répétée (Rodriguez et Bockus, 1996). Les résultats obtenus permettent d'avoir une idée préliminaire quant à l'effet de la présence de ces isolats dans les champs de blé en Algérie. Toutefois, l'étude de la sporulation *in vitro* ne tient pas compte de l'effet de la physiologie et de l'interaction de l'hôte, ni des effets complexes du génotype de blé, de la position des feuilles, de l'isolat fongique, de la période humide, etc. (Cox et Hosford, 1987 ; Hosford *et al.*, 1990).

Par conséquent, il serait intéressant dans le future de compléter la présente étude par une autre sur des feuilles de blé *in vivo*. Ceci apportera une meilleure aide pour prévoir les épidémies de cette maladie. Dans le pathosystème du maïs/*Bipolaris maydis*, Nelson et Tung (1973) ont trouvé une relation positive entre la sporulation sur l'hôte et la gravité de la maladie. Par ailleurs, la sporulation sur le tissu de l'hôte fournit également un moyen pour évaluer la résistance de l'hôte à l'égard de l'agent pathogène (Riaz *et al.*, 1991).

#### **IV.5. Analyse de la diversité génétique des isolats de *P. tritici-repentis* par les marqueurs moléculaires**

##### **IV.5.1. Evaluation de la qualité et de la quantité de l'ADN extrait**

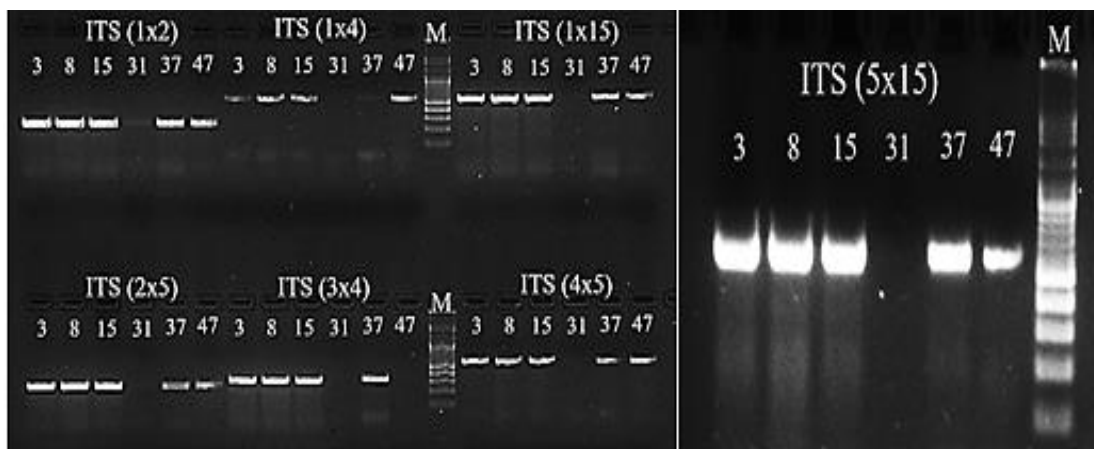
L'ensemble des échantillons d'ADN extraits de la collection ont fait l'objet d'une évaluation de la concentration et la pureté à l'aide d'un NanoDrop. Les concentrations obtenues sont jugées

appréciables, il en est de même pour leur qualité, puisque nous avons noté un rapport  $Do_{260}/Do_{280}$  satisfaisants quant à l'absence de protéines. La qualité des ADN extraits a également été vérifiée par une migration sur gel d'agarose à 0,8 % ; les résultats obtenus ont montré des bandes claires pour l'ensemble des échantillons ce qui indique la présence d'ADN de bonne qualité. L'extraction a été répétée pour les isolats qui ont montré de faibles bandes, des rapports  $Do_{260}/Do_{280}$  inadéquat (inférieur à 1) ou des concentrations très faibles (inférieur à 100 ng/ $\mu$ l).

#### IV.5.2. Sélection des marqueurs moléculaires pour l'analyse de la diversité génétique

Afin d'étudier la diversité génétique, plusieurs marqueurs moléculaires ont été testés ; à savoir ITS, ISSR, RAPD, RFLP, SCoT et SSR. Les résultats ont été vérifiés sur gel d'agarose à une concentration de 1,5 % (ISSR et RAPD) ou de 2 % (ITS, RFLP et SCoT).

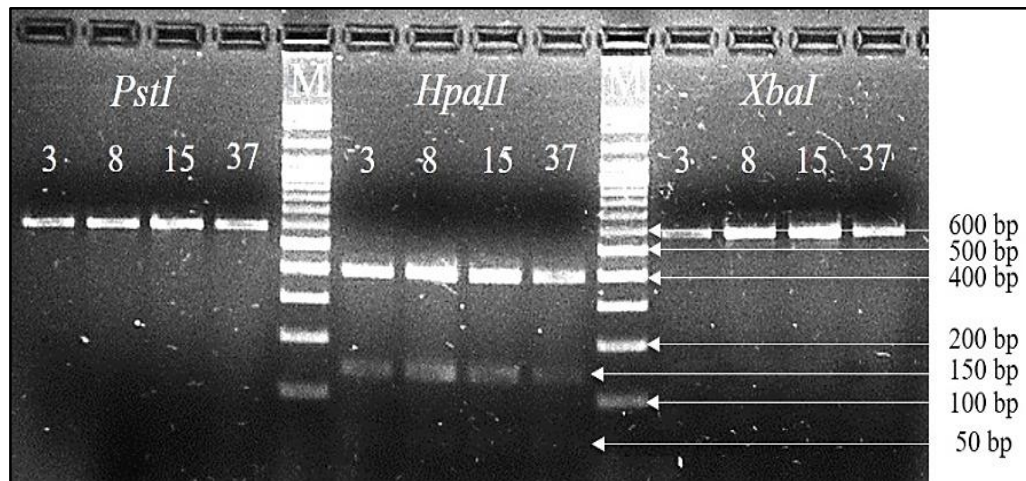
Sur les 15 combinaisons de marqueurs ITS testées, 8 (ITS1xITS2, ITS1xITS4, ITS1xITS15, ITS2xITS5, ITS3xITS4, ITS3xITS15, ITS4xITS5 et ITS5xITS15) avaient révélés des bandes d'intensité uniforme. Toutefois aucun polymorphisme n'a été révélé, aussi bien pour l'essai sur 2 isolats, que celui sur 6 isolats, provenant de régions différentes (Fig. 17).



**Figure 17 :** Visualisation des produits PCR sur gel d'agarose 2 % après amplifications par les marqueurs ITS. 3-47 : Isolats de *P. tritici-repentis* ; ITS1-ITS15 : Amorces ; M : Marqueur de poids moléculaire (marqueur d'ADN de 100 bp, Vivantis Company).

Les PCR réalisées avec les 9 marqueurs ISSR n'ont permis aucune amplification, alors que les résultats obtenus avec les 4 amorces RAPD, ont révélé une amplification avec une seule des amorces testées. Ceci, chez un seul échantillon, qui a montré une bonne bande unique. Les résultats n'ont pas été meilleurs lorsque différentes concentrations d'ADN ont été utilisées.

Concernait les optimisations de la RFLP, parmi les 3 enzymes de restriction testés sur les produits PCR obtenus lors des amplifications des ITS, les résultats ont montré qu'une seule enzyme de restriction (*HpaII*) a été active sur les échantillons testés. L'enzyme *HpaII* a digéré les produits PCR 4 fois ; ceci est montré par la présence de 3 bandes, de tailles différentes (400, 150 et 50 bp), comparées au profil des échantillons non traités par *HpaII*, qui n'avaient qu'une seule bande 600 bp (Fig. 18). Toutefois aucun polymorphisme n'a été détecté entre les isolats.



**Figure 18 :** Visualisation des produits PCR sur gel d'agarose 2,5 % après digestion. 3-37 : Isolats de *P. tritici-repentis* ; *PstI*, *HpaII*, *XbaI* : Enzymes de restriction ; M : Marqueur de poids moléculaire (marqueur d'ADN de 100 bp, Vivantis Company).

Les PCR réalisées avec les marqueurs SSR, n'ont concerné que 4 échantillons d'ADN de différentes régions géographiques et 8 amorces. Les résultats obtenus ont montré des bandes polymorphes de faible intensité, observées pour 2 amorces uniquement (DTR6 et DTR7). Le reste des amorces n'ont pas donné de polymorphisme recherché. Suite à une optimisation des conditions d'amplification, il a été conclu que la température optimale d'hybridation pour ces deux amorces était de 55 °C.

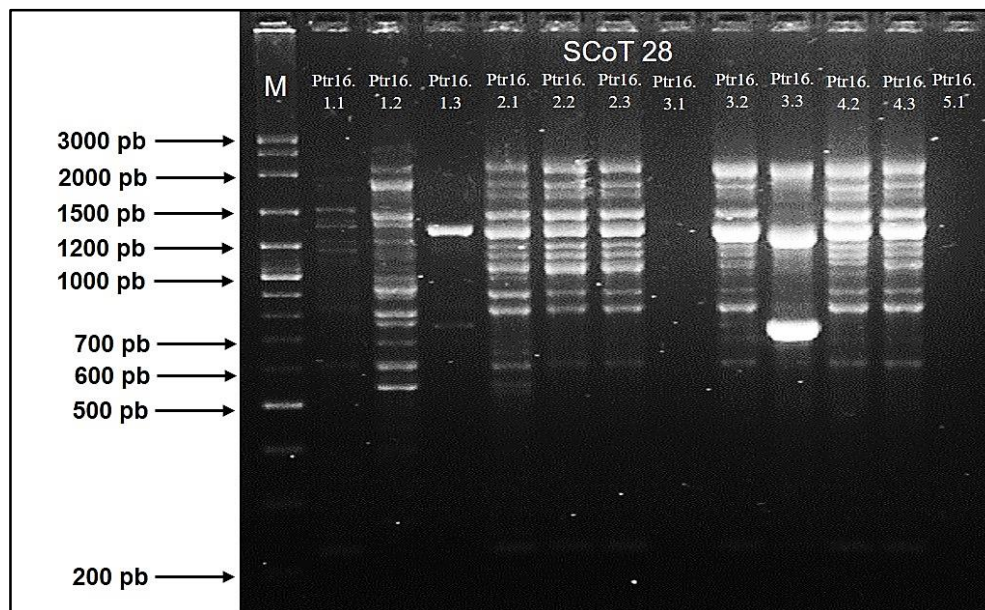
Les PCR réalisées avec les marqueurs SCoT testés, avec différentes taq polymérases, ont montré que les meilleurs résultats étaient obtenus avec le COSMO master mix selon les volumes recommandés par le fabriquant. Les amorces sélectionnées, sont SCoT3, SCoT5, SCoT16, SCoT22, SCoT28, SCoT33, SCoT35, et SCoT36.

Sur la base de ces résultats, nous avons choisi d'appliquer des marqueurs SCoT et SSR, car ce sont ceux qui ont révélé un polymorphisme *via* les amorces sélectionnées, ayant amplifiées les ADN testés. Le protocole du COSMO master mix, a été adopté pour le reste du travail.

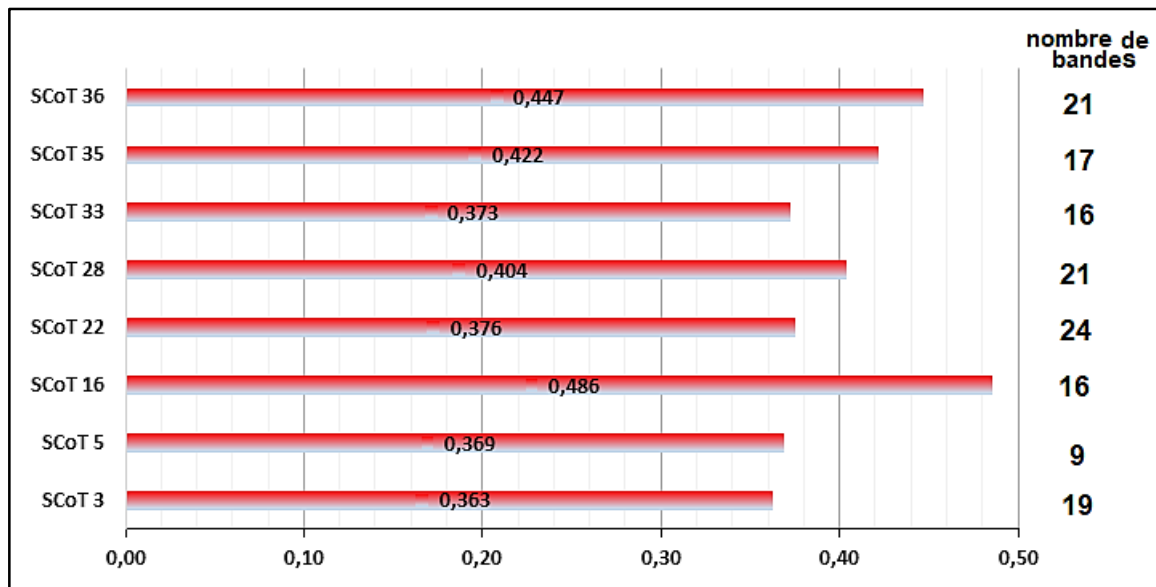
### IV.5.3. Analyse de la diversité génétique par les marqueurs SCoT

Suite à la sélection réalisée, 8 marqueurs SCoT ont été employés pour étudier la diversité génétique d'une population algérienne de 85 isolats de *P. tritici-repentis*. Après l'amplification, les produits PCR obtenus ont été visualisés sur un gel d'agarose de 2 %. Les résultats obtenus ont montré que toutes les amorces utilisées ont amplifiées des régions dans les génomes analysés. Ceci est confirmé par la présence de bandes de différentes tailles (Fig. 19), qui ont varié entre 370 pb et 2800 pb. Un total de 143 bandes a été détecté ; soit une moyenne d'environ 18 par amorce. Le nombre de bandes par amorce variait de 9 (amorce SCoT5) à 24 (amorces SCoT22) (Fig. 20).

Nous avons remarqué cependant une absence d'amplification chez les isolats 1, 6 et 13 et ce pour toutes les amorces testées. De même dans certains cas, nous avons noté l'absence d'amplification chez certains isolats pour une ou plusieurs amorces. A cet effet, lors de l'analyse statistique des données moléculaires, un pourcentage maximum de 25% des données manquantes a été admis. Ainsi le nombre d'isolats ayant été considérés dans cette analyse est de 73 isolats.



**Figure 19 :** Visualisation des produits PCR sur gel d'agarose 2 % après amplifications par l'amorce SCoT28. **1-12 :** Isolats de *P. tritici-repentis* ; **M :** Marqueur de poids moléculaire (marqueur d'ADN de 100 bp, Vivantis Company).



**Figure 20 :** Valeurs moyennes du PIC pour chacune des amorces, et nombre de bandes générées par chacune d’elles.

Le nombre de *loci* (bandes) révélé par isolat a varié entre 20 et 76 dont certains étaient plus fréquents que d’autres dans la population étudiée. En effet, alors que certains se sont révélés présents chez presque la totalité des isolats étudiés, d’autres n’ont été mis en évidence que chez un seul isolat. Ainsi, nous pouvons constater par exemple, que les deux marqueurs M91 et M108, amplifiés respectivement par les amorces SCoT33 de 1945 pb, et SCoT35 de 1680 pb, sont présents chez 72 isolats étudiés. De même, trois marqueurs M27, M98 et M100, dont les tailles sont de 710 pb, 805 pb et 610 pb, mis en évidence par les amorces SCoT5, SCoT22, et SCoT28 respectivement, se sont révélés présents chez 71 isolats. A l’opposé, 40 marqueurs ne sont présents que chez un seul isolat de la collection analysée.

Les valeurs du PIC (contenu informatif du polymorphisme) pour chaque marqueur SCoT ont varié entre 0,363 et 0,486 (Fig. 20). L’analyse de ces valeurs nous a permis de constater que l’amorce SCoT3, représente une valeur du PIC faible de l’ordre de 0,363, alors que la valeur la plus élevée 0,486, est celle de l’amorce SCoT16. Une valeur du PIC plus élevée met en évidence l’importance de l’amorce en question, car c’est celle qui donne le plus de polymorphisme. C’est donc celle qui possède plus de pouvoir discriminant.

L’analyse hiérarchique basée sur la distance génétique exprimée par le coefficient de Jaccard, met en évidence dix différents ensembles à un niveau de similarité de 50 % (Fig. 21). Le premier ensemble est formé par 7 isolats. Ces derniers ont été isolés dans la région de Béjaïa. Le second est formé par l’isolat 16.4.3, également de la région de Béjaïa. Le troisième est formé par 7 isolats ; un isolat, Ptr 16.5.3 originaire de Béjaïa, et le reste ont été isolés dans la région d’Ain

Defla. Le quatrième ensemble est formé par un seul isolat, Ptr 16.8.1, originaire de la région d'Alger. Le cinquième est formé de 16 isolats isolés dans de différentes régions à savoir Alger, Blida, Sétif. Le sixième est formé par un seul isolat Ptr 16.14.2 isolé dans la région de Blida. Le septième est formé par 22 isolats qui ont été isolés dans 4 différentes régions, Blida, Médéa, Alger et Béjaïa, alors que le huitième est formé de 11 isolats, isolés dans les régions : Alger, Blida et Constantine. Le neuvième est formé d'un seul isolat 5.3 isolé dans la région de Blida. Enfin le dernier ensemble est formé de 6 isolats originaires des régions d'Alger et Blida.

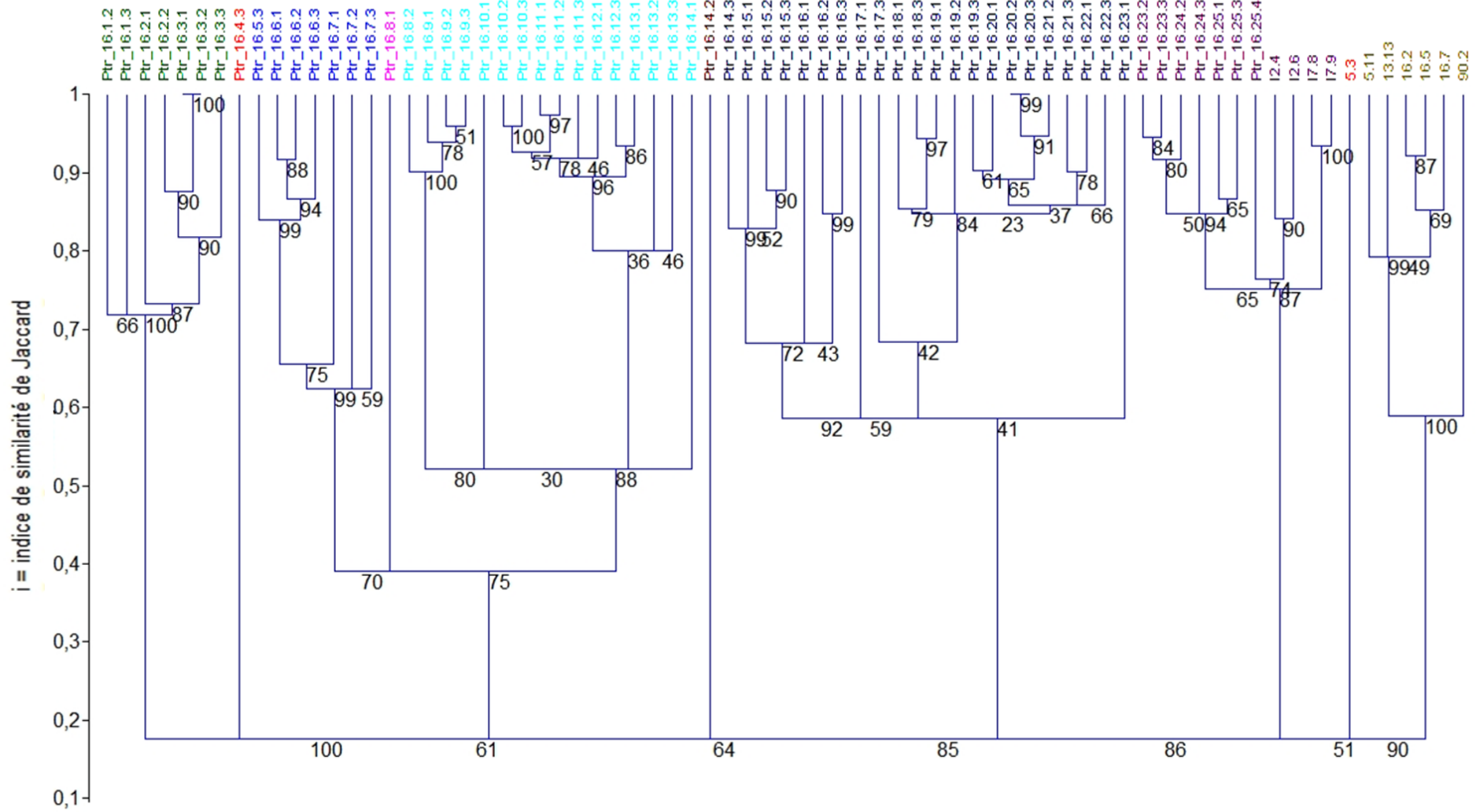
A l'intérieur de ces différents ensembles, nous pouvons identifier plusieurs groupes à différents niveaux de dépendance (Fig. 21). Plusieurs isolats peuvent se distinguer à l'intérieur de ces ensembles, en formant un groupe à part ; tel est le cas de l'isolat 90.2 dans le dernier ensemble.

Les différents groupements révélés sur le dendrogramme ne peuvent être expliqués par l'origine géographique ; nous constatons que des isolats provenant de localités différentes peuvent être retrouvés dans un même ensemble. Cependant des exceptions sont à considérer ; tel est le cas des 7 isolats, originaires de Béjaïa retrouvés dans un même groupe à un niveau de similarité de 50 %, ou encore pour les isolats Ptr 16.4.3, isolé de la région de Béjaïa, et 5.3 et Ptr 16.14.2, isolés de la région de Blida ; qui se retrouvent chacun dans des groupes à part.

De même, ces regroupements ne trouvent pas d'explication lorsque l'espèce de blé à partir de laquelle les isolats ont été isolés est considérée, puisqu'il est possible de retrouver des isolats provenant de blé dur qui sont réunis avec d'autres isolés de blé tendre. Tel est le cas des deux isolats Ptr 16.20.3 isolé de blé dur et l'isolat Ptr 16.21.2 isolé de blé tendre. Nous notons également que les isolats provenant de la même lésion ne se retrouve pas rassemblés au même niveau. C'est le cas des deux isolats Ptr 16.8.1 et l'isolat Ptr 16.8.2 (Fig. 21).

L'indice de Jaccard a permis d'évaluer le degré de similarité existant entre chaque paire des différents individus de la population pathogène analysée. Sa valeur a varié entre 5,56 % et 98,55 % (Annexe 15), ce qui indique une diversité très importante du pathogène. L'isolat 5.3 qui s'est distingué lors de l'analyse hiérarchique, présente des valeurs d'indice de Jaccard faibles, avec les autres individus de la population analysée. Elles sont comprises entre 5,56 % de similarité avec l'isolat Ptr 16.14.2 et 23,33 % de similarité avec Ptr 16.8.1, ce qui confirme la différence de cet isolat par rapport aux autres.



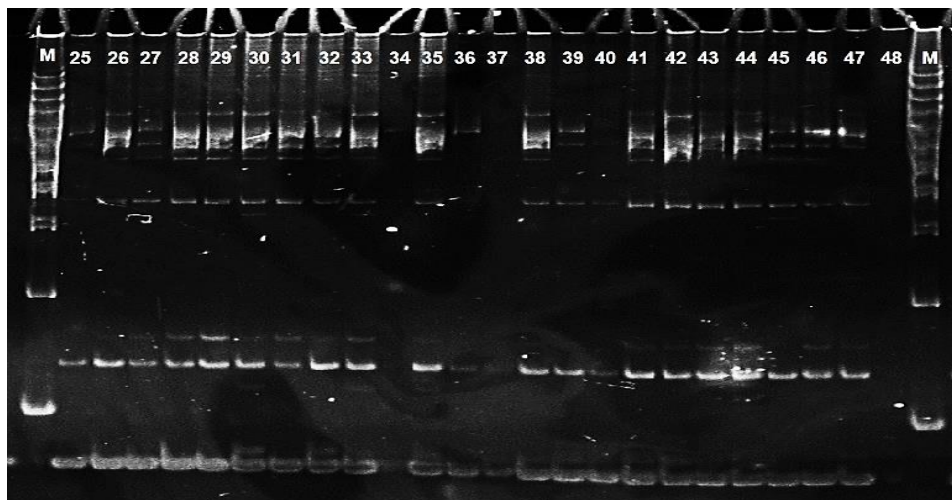


**Figure 21 :** Dendrogramme généré sur la base des distances de similarité de Jaccard montrant la classification hiérarchique de l'ensemble des isolats de la collection analysée.

Le test de Bootstrap généré lors de la classification hiérarchique, révèlent des valeurs comprises entre 23 et 100 %. Toutefois nous avons noté que plus que la moitié des individus de la population sont supérieures à 80 % ; les nœuds affectés par ces valeurs, traduisent une meilleure robustesse des branches concernées.

#### IV.5.4. Analyse de la diversité génétique par les marqueurs SSR

Huit marqueurs SSR ont été utilisés pour étudier la diversité génétique de 85 isolats de *P. tritici-repentis*. Après l'amplification, les produits PCR obtenus ont été visualisés sur un gel de polyacrylamide de 9 % (Fig. 22). Les résultats obtenus ont montré que seules 2 amorces ont permis l'amplification de plusieurs régions dans les ADN analysés, et elles ont révélé un polymorphiques, à travers 17 bandes détectées (Fig. 22). Le nombre de bandes par amorce variait de 2 (amorces DTR6), à 15 (amorce DTR7). Etant donné le faible nombre d'amorces ayant permis d'amplifier les ADNs étudiés, les résultats obtenus par les marqueurs SSR, n'ont pas été analysés séparément. Ils ont été réunis avec les résultats obtenus par les marqueurs SCoT, dans une matrice globale binaire (1,0) pour une seconde analyse de la diversité.

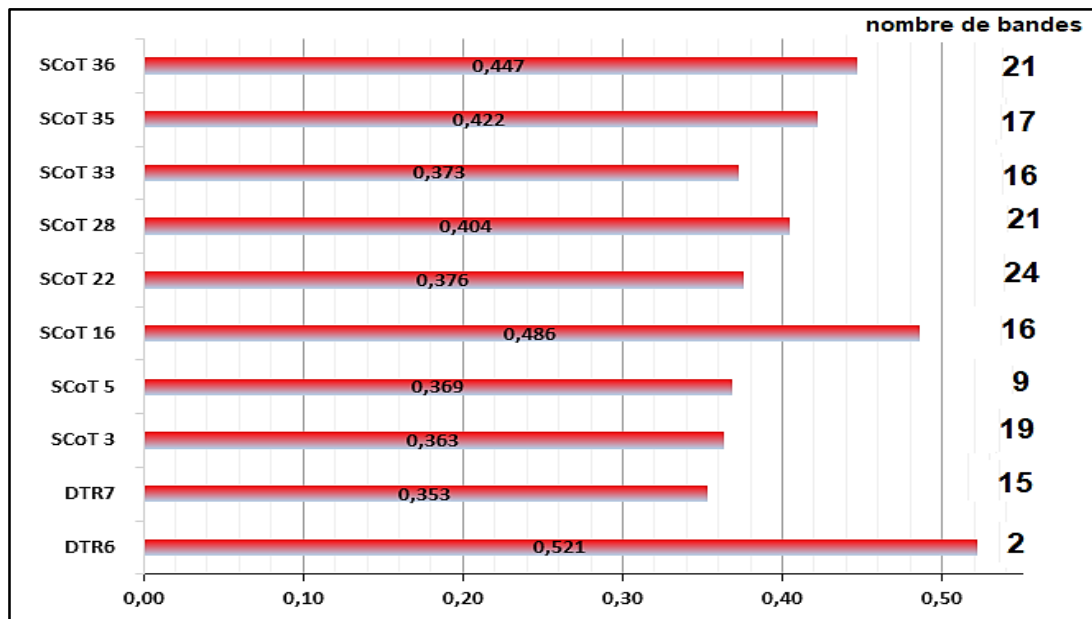


**Figure 22 :** Visualisation des amplicants générés par l'amorce DTR7 sur gel de polyacrylamide à 9 %. **1-12 :** Isolats de *P. tritici-repentis* ; **M :** Marqueur de poids moléculaire (marqueur d'ADN de 100 bp, Vivantis Company).

#### IV.5.5. Analyse globale de la diversité génétique par les marqueurs SCoT et SSR

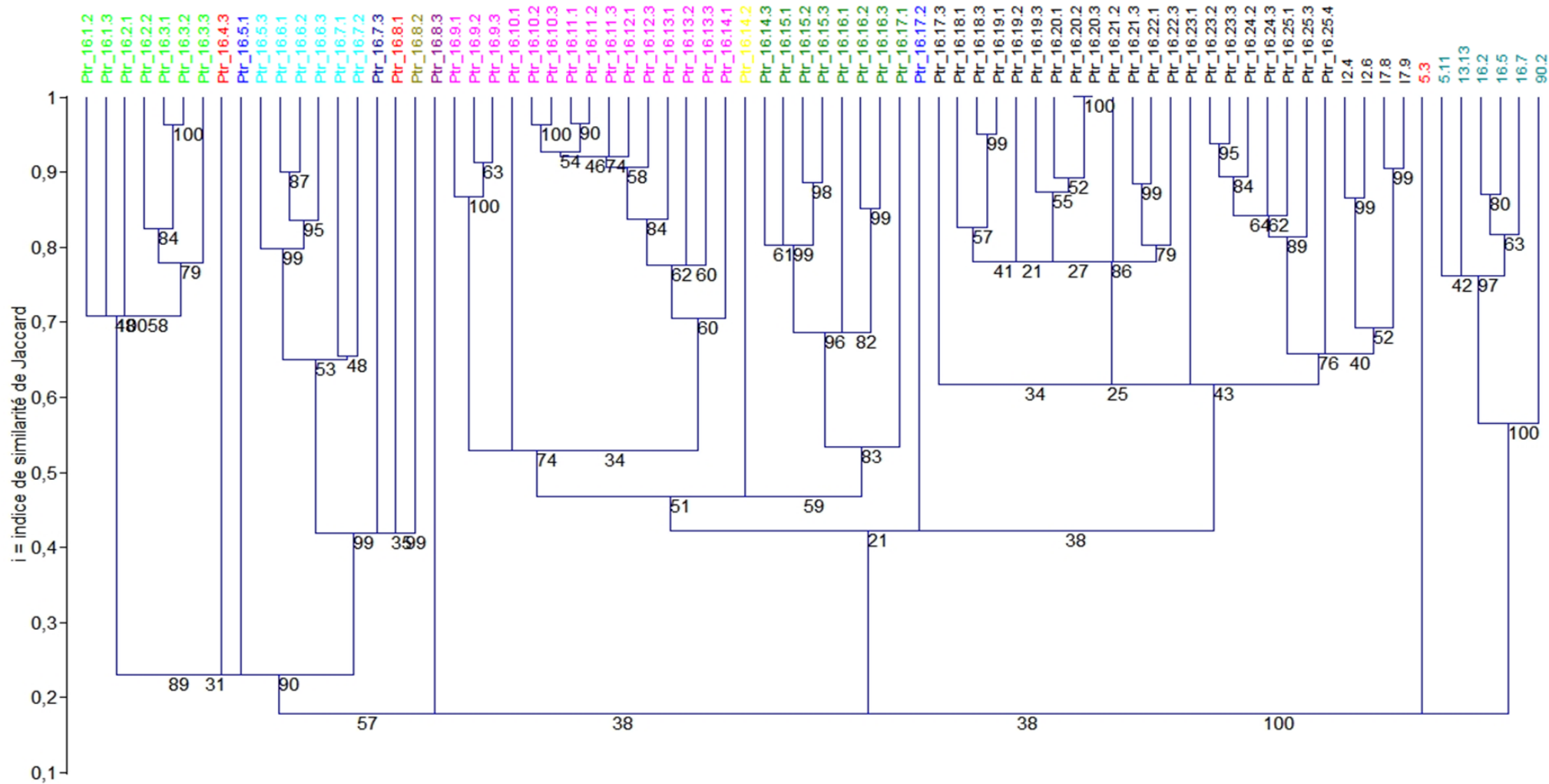
L'ensemble des résultats obtenus chez 76 isolats par les deux marqueurs SCoT et SSR, ont permis de réaliser une nouvelle analyse à travers laquelle 160 bandes amplifiées ont été utilisées. Ainsi leur nombre considéré dans cette analyse par isolat, a varié entre 20 et 76.

La comparaison entre les valeurs du PIC (contenu informatif du polymorphisme) pour chaque marqueur (8 SCoT et 2 SSR), a permis de mettre en valeur celui qui possédait le meilleur pouvoir discriminant (Fig. 23). Ces valeurs ont varié entre 0,353 et 0,521. Leur analyse nous a permis de constater que l’amorce DTR7 représente une valeur du PIC faible de l’ordre de 0,353, alors que la valeur du PIC la plus élevée 0,521 est retrouvée chez l’amorce DTR6. Une valeur du PIC plus élevée montre l’importance de son pouvoir discriminant, car elle révèle le plus de polymorphisme possible entre les génomes analysés.



**Figure 23 :** Valeurs moyennes du PIC pour chacune des amorces (SCoT et SSR), et nombre de bandes générées par chacune d’elles.

L’analyse hiérarchique basée sur la distance génétique met en évidence quinze différents ensembles à un niveau de similarité de 50 % (Fig. 24). Certains réunissent plusieurs isolats, alors que d’autres un isolat unique. L’ensemble qui est formé par le plus grand nombre d’isolats, est celui qui réunit 25 isolats : ils ont été isolés dans les régions d’Alger, de Béjaïa, de Blida et de Constantine. Un autre ensemble est formé de 15 isolats de différentes provenances, puis nous notons un autre, formé par 8 isolats, qui ont été isolés dans 3 différentes régions ; Blida, Médéa et Béjaïa. L’ensemble formé par 7 isolats, regroupe ceux isolés dans la région de Bejaïa. Deux ensembles réunissant 6 isolats ont été retrouvés ; le premier regroupe un isolat Ptr 16.5.3 originaire de Béjaïa, et 5 autres isolés dans la région d’Ain Defla, alors que le second, est formé d’isolats originaires des régions d’Alger et Blida. Le reste des groupes ; à savoir 9 ensembles, sont formés chacun par un isolat unique, de provenances variées. A l’intérieur des différents ensembles nous pouvons identifier plusieurs groupes à différents niveaux de dépendance (Fig. 24).



**Figure 24 :** Dendrogramme généré sur la base des distances de similarité de Jaccard montrant la classification hiérarchique de l'ensemble des isolats de la collection analysée.

A travers l'analyse globale, il n'a pas été aussi possible de trouver de corrélation évidente entre les différents groupements révélés sur le dendrogramme et l'origine géographique, ou l'espèce de blé à partir de laquelle les isolats ont été isolés.

L'indice de Jaccard a permis d'évaluer le degré de similarité existant entre chaque paire des différents individus de la population pathogène analysée. Sa valeur a varié entre 2,86 % et 96,34 % (Annexe 16), ce qui confirme encore une diversité très importante du pathogène. L'isolat Ptr 16.8.3 qui s'est distingué lors de l'analyse hiérarchique, présente des valeurs d'indice de Jaccard faibles avec les autres individus de la population analysée. Elles sont comprises entre 2,86 % de similarité avec l'isolat Ptr 16.17.1 et 25 % de similarité avec 5.3, ce qui confirme la différence de cet isolat par rapport aux autres.

Le Test de Bootstrap a généré lors de la classification de l'ensemble des individus de la population, des valeurs comprises entre 23 et 100 %. Toutefois nous avons noté que plus que la moitié des valeurs de la population sont supérieures à 80 % ; les nœuds affectés par ces valeurs, traduisent une meilleure robustesse des branches concernées.

## **Discussion**

La diversité génétique de 76 isolats d'une population algérienne de *P. tritici-repentis* a été évaluée dans une analyse globale moyennant ensemble des marqueurs SCoT et SSR. Un niveau élevé de variabilité génétique a été démontré entre les isolats collectés dans différentes régions céréalières d'Algérie. Sur l'ensemble des 73 isolats composant la population analysée par les marqueurs SCoT seuls, 70 haplotypes différents ont été révélés, alors que les marqueurs SSR seuls, ont révélé la présence de 40 haplotypes différents chez 76 isolats. Ce travail est la deuxième étude de la diversité génétique de la population de *P. tritici-repentis* en Algérie, après une première déjà réalisée par Benslimane *et al.* (2013) en utilisant des marqueurs AFLP.

L'amorce DTR6 amplifiant des régions microsatellites dans le génome, a été la plus informative puisqu'elle a permis de révéler des *loci* qui présentent en moyenne la valeur du PIC la plus élevée et de ce fait, elle présente donc le pouvoir discriminant le plus fort.

Les marqueurs SSR ont été utilisés pour l'étude de la diversité génétique dans les populations de différentes espèces fongiques, car ils sont hautement polymorphes entre les souches, co-dominantes et hautement reproductibles par rapport aux autres marqueurs (Hudcovicora *et al.*, 2015). Les microsatellites sont en effet, la partie du génome fongique qui évolue le plus rapidement (Linde *et al.*, 2010). Au cours de la dernière décennie, leur utilisation est devenue fréquente (Adhikari *et al.*, 2008 ; Bogacki *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2012 ; Leisova *et al.*, 2014).

Suite au séquençage du génome de *P. tritici-repentis* (Broad Institute, 2007 ; Manning *et al.*, 2013), et le développement d'amorces SSR cartographiés sur différents chromosomes de *P. tritici-repentis* (Aboukhaddour *et al.*, 2011 ; Gurung *et al.*, 2013), il est devenu possible d'utiliser ce type de marqueurs pour l'analyse des populations de ce pathogène.

Les marqueurs SCoT ont été utilisés initialement pour l'étude de la diversité génétique des plantes (Collard et Mackill, 2009), puis récemment chez quelques champignons phytopathogènes (Nath *et al.*, 2013). Ces marqueurs sont reproductibles et faciles à manipuler (Collard et Mackill, 2009).

L'importante diversité génétique observée, peut être expliquée par la biologie du champignon, ainsi que par son épidémiologie. *P. tritici-repentis* est un champignon homothallic qui se reproduit à la fois sexuellement et asexuellement. La reproduction sexuée a lieu sur les chaumes de blé entre les saisons. La reproduction asexuée est prédominante pendant la saison de croissance sur la culture de blé et se produit en plusieurs cycles (Ciuffetti et Tuori, 1999). Selon De Wolf *et al.* (1998) et Schilder et Bergstrom (1995), dans des conditions favorables, les conidiophores de *P. tritici-repentis* peuvent se déplacer de 10 à 200 km, l'inoculum est également porté par les semences. Il y a donc un mouvement possible de l'inoculum sur de longues distances. Par conséquent, cette dispersion sur de longues distances et la présence de la reproduction sexuée peuvent contribuer pas uniquement à la propagation de l'infection, mais également à une diversité génétique accrue, indépendamment de l'origine géographique ou de la classification en races (Singh et Hughes, 2006 ; Leisova *et al.*, 2008).

De nombreux facteurs peuvent contribuer également aux changements génétiques au sein des populations fongiques. Ces facteurs comprennent la mutation, le système de reproduction, le flux ou la migration des gènes, la taille de la population et la sélection (McDonald, 1997 ; McDonald *et al.*, 1989).

Par ailleurs, les graminées sauvages hôtes, pourraient également représenter une source importante de variabilité génétique, car ils peuvent constituer un grand réservoir de nouveaux biotypes génétiquement différents de ceux qui prévalent dans le blé cultivé (Krupinsky, 1987 ; De Wolf *et al.*, 1998). Or de nombreuses espèces appartenant à cette famille botanique, reconnues pour être des hôtes naturelles du *P. tritici-repentis*, existent en Algérie et poussent naturellement à proximité des champs cultivés de blé.

Depuis le début des années 2000, les populations de *P. tritici-repentis* ont été étudiées à l'aide de différents marqueurs moléculaires, notamment RAPD (Dos Santos *et al.*, 2002 ; Singh et

Hughes, 2006 ; Mironenko *et al.*, 2007), AFLP (Friesen *et al.*, 2005 ; Leisova *et al.*, 2008), ISSR (Moreno *et al.*, 2008a), ITS-RFLP (Lepoint *et al.*, 2010), et SSR (Hudcovicova *et al.*, 2015).

La diversité génétique a été étudiée à partir des populations de diverses provenances. Ces populations étaient constituées d'isolats provenant d'Amérique du Nord, notamment du Canada et des États-Unis (Friesen *et al.*, 2005 ; Leisova *et al.*, 2008 ; Singh and Hughes 2006) ; d'Amérique du Sud, notamment d'Argentine et de Brésil (Friesen *et al.*, 2005 ; Dos Santos *et al.*, 2002 ; Moreno *et al.*, 2008a) ; d'Europe, notamment d'Allemagne, de République tchèque, de République slovaque, de Russie et de Finlande (Friesen *et al.*, 2005 ; Leisova *et al.*, 2008 ; Mironenko *et al.*, 2007 ; Hudcovicova *et al.*, 2015) et d'Afrique du Nord, notamment du Maroc et d'Algérie (Gamba *et al.*, 2017 ; Benslimane *et al.*, 2013). Les différents résultats et conclusions rapportées, vont dans le même sens, que celles auxquelles aboutissent nos résultats.

Dos Santos *et al.* (2002) ont utilisé des marqueurs RAPD pour évaluer le niveau et la distribution de la variation génétique au sein des populations de plusieurs régions du Brésil. Ils ont trouvé 45 bandes en utilisant 9 marqueurs RAPD. Ils n'ont pas été en mesure d'établir une relation entre les polymorphismes de l'ADN et les régions géographiques d'où provenaient les isolats. Singh et Hughes (2006) ont obtenu des résultats similaires en appliquant la même technique pour étudier la diversité de 30 isolats canadiens.

Dans le travail effectué par Aung (2001), l'analyse des marqueurs RAPD a été utilisée pour montrer une importante différenciation entre les races pathogènes et non pathogènes, et également une autre différenciation moins importante mais significative, au sein de la population pathogène (races 1, 2, 3, 5 et 6). Dans le deuxième cas, les différences se sont révélées existées, d'une part entre les isolats induisant une nécrose (races 1 et 2), et ceux n'induisant pas de nécrose (races 3, 5 et 6), et d'une autre part entre la race 3 et la race 5, ces races induisent toutes les deux des formes distinctes de chloroses. Dans ce contexte, Mironenko *et al.* (2007) ont montré que la plupart des variations génétiques se produisent au sein des populations (72-75 %) plutôt qu'entre elles (25-28 %).

Gurung *et al.* (2013) ont observé des résultats similaires en utilisant 12 marqueurs SSR pour 439 isolats de *P. tritici repentis* provenant de 5 continents. Ils ont signalé 25 allèles avec une moyenne de 3 à 4 allèles par *locus*.

Dans l'étude menée sur 24 isolats par Hudcovicova *et al.* (2015) en utilisant les marqueurs SSR et RAPD, seuls deux isolats n'ont pas été différenciés. L'analyse en composantes principales

(ACP) créée à partir des données RAPD a montré une plus grande variabilité entre les isolats que celle créée à partir des données SSR (Hudcovicova *et al.*, 2015).

Friesen *et al.* (2005) ont utilisé les marqueurs AFLP sur des isolats d'Amérique du Nord, d'Amérique du Sud, et d'Europe. Les résultats obtenus avec seulement deux combinaisons d'amorces, n'ont montré aucune corrélation entre le regroupement génétique des isolats fongiques, et leur classification en races, et non plus entre les isolats provenant de régions et même de pays éloignés, qui présentaient dans certains cas une grande similarité génétique. Toutefois en utilisant des marqueurs AFLP, Leisova *et al.* (2008), ont signalé la distinction de la race 4, à une distance génétique plus élevée.

Un polymorphisme génétique élevé a été détecté parmi 37 isolats en Argentine par Moreno *et al.* (2008b), moyennant cinq marqueurs ISSR. Dans cette étude seulement 2 des 37 isolats n'ont pas été différenciés.

Des niveaux élevés de polymorphisme génétique parmi les isolats de *P. tritici-repentis* ont été trouvés avec l'utilisation de marqueurs SSR, RAPD, AFLP et ISSR, mais souvent sans corrélation avec l'origine géographique, la production de toxines, la pathogénicité ou la classification de la race des isolats (Dos Santos *et al.*, 2002 ; Friesen *et al.*, 2005 ; Singh et Hughes, 2006 ; Iram et Ahmad, 2007 ; Leisova *et al.*, 2008 ; Moreno *et al.*, 2008 ; Hudcovicova *et al.*, 2015). Friesen *et al.* (2005), ont expliqué que cela indique que, dans les populations sauvages, *P. tritici-repentis* avait une tendance à se croiser. Selon ces auteurs, cette situation est le résultat du fait que l'introduction du pathogène et sa propagation sont récentes ou qu'il existe un flux de gènes à travers différentes zones en raison de l'échange de semences.

Cependant, selon Leisova *et al.* (2008), la similarité génétique révélée par les marqueurs AFLP peut être partiellement expliquée par la classification des races, la plante hôte et l'origine géographique. Et que chaque facteur a un impact sur la structure de l'agent pathogène.

La détermination de la variabilité ; notamment la variation génétique des organismes tels que les champignons phytopathogènes devrait être une activité permanente pour des programmes de sélection efficaces. La perte de résistance des cultivars commerciaux, produite par l'émergence de nouveaux pathotypes inconnus, a été en effet démontrée (Young et Kelly, 1997). Le succès des programmes locaux de sélection pour la résistance à la maladie, dépend en grande partie notamment de la connaissance de la variation génétique au sein des populations pathogènes.

Le présent travail a révélé des génotypes de blé dur et de blé tendre utilisés en culture, sensibles à ce pathogène. De même qu'il a confirmé une nouvelle fois que la population de cet



agent pathogène en Algérie est très diversifiée sur le plan génétique ainsi que sur le plan morphologique. Comme ce champignon possède les deux types de reproduction, sexuée et asexuée, le risque qu'il surmonte la résistance de l'hôte au fil du temps est encore plus accrue. D'autant plus que la reproduction sexuée permet de recombinaison des gènes de virulence nouveaux avec ceux déjà existants, et donc crée de nombreux nouveaux profils de virulence. Dans ce contexte selon McDonald et Linde (2002) les agents pathogènes qui subissent une recombinaison régulière présenteraient des risques plus élevés que les pathogènes qui ne subissent pas ou peu de recombinaison. La reproduction sexuée, leur permet en effet d'évoluer rapidement pour surmonter les gènes de résistance en réponse à la pression de sélection imposée par les cultivars résistants, ce qui a été fréquemment signalé dans de nombreux pathosystèmes (Linde *et al.*, 2002).

Par conséquent, l'étude continue de la variabilité génétique des populations d'agents pathogènes des plantes pourrait probablement conduire à une meilleure gestion des maladies dans les écosystèmes agricoles. Elle est nécessaire pour prendre des décisions appropriées dans les programmes de sélection, notamment lors du développement de cultivars résistants, de fongicides efficaces, et d'agents de contrôle biologique. Elle permet en effet d'évaluer la capacité des pathogènes à répondre rapidement aux changements de l'environnement et surmonter la résistance de l'hôte et les traitements fongicides (Peltonen *et al.*, 1996).

#### **IV.6. Etude de la variabilité génétique du gène ToxA**

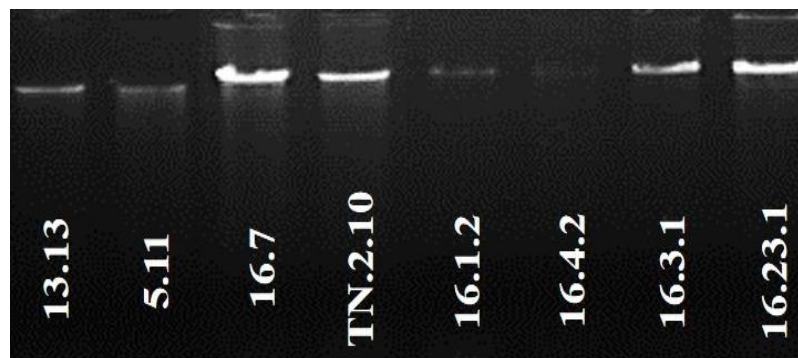
##### **VI.6.1. Amplification du gène ToxA**

Afin de confirmer la présence ou l'absence du gène ToxA responsables de la synthèse de la toxine Ptr ToxA, l'ADN génomique de l'ensemble des isolats de la collection a été extrait, les concentrations des ADN et leurs qualités respectives, ont été estimées. La quantité et la qualité des ADNs obtenues à chaque extraction sont jugées appréciables pour la plus part des isolats, puisque nous avons noté dans la plupart des extraits un rapport  $Do_{260}/Do_{280}$  compris entre 1.8 et 2. Toutefois quelques valeurs se sont révélées en dehors de cet intervalle, soit inférieur à 1.8 indiquant une présence de protéines, ou supérieur à 2 indiquant la présence d'ARN.

Dans ces cas, certaines étapes de l'extraction ont été reprises à nouveau sur les échantillons concernés (Fig. 25).

Ainsi, telle que la montrée la visualisation des ADNs extraits sur gel d'agarose à 0.8 %, les modifications apportées dans le protocole classique, ont été favorables, et ont permis de faire

l'extraction d'ADN avec succès, confirmée par la quantité d'ADN fournie, par sa qualité, et par les PCR effectuées. En effet le verre broyé a été utilisé au lieu de l'azote liquide, et la protéinase K au lieu du phénol.



**Figure 25 :** Visualisation des ADNs extraits à partir des isolats de *P. tritici-repentis* sur gel d'agarose de 0,8 %.

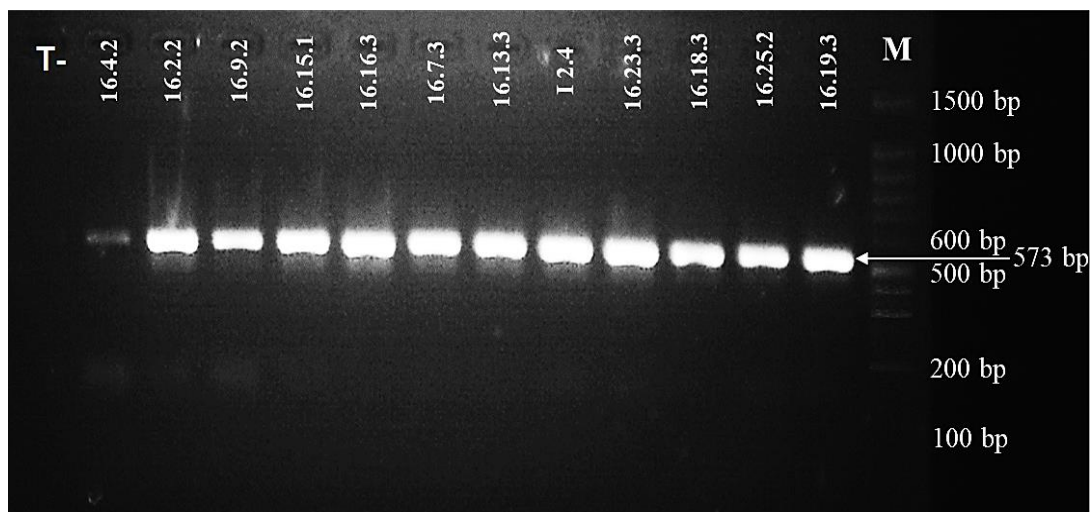
Les résultats d'amplification du gène étudié sont réunis dans le tableau XV, et représentés à travers la figure 26. Cette dernière montre une bande à la taille attendue de 573 pb, correspondante à presque la totalité de la région codante de ToxA.

Les isolats utilisés comme témoins ont montré les résultats attendus ; le témoin positif (la souche de référence de la race1), a donné des bandes typiques bien claires et intenses après l'amplification de leurs ADN, alors que le témoin négatif n'a donné aucune bande. Ces réactions confirment la réussite de l'amplification et l'absence de toute contamination.

Tableau XV : Présentation des résultats obtenus après amplification des gènes ToxA.

Isolat	ToxA	Isolat	ToxA	Isolat	ToxA	Isolat	ToxA	Isolat	ToxA
Ptr 1	+	Ptr 82	+	76.4	-	Ptr 16.5.3	+	Ptr 16.20.1	+
Ptr 4	+	7.1	-	76.7	-	Ptr 16.6.1	+	Ptr 16.20.2	+
Ptr 6	+	7.2	-	77.1	-	Ptr 16.6.2	+	Ptr 16.20.3	+
Ptr 9	+	7.3	+	77.3	+	Ptr 16.6.3	+	Ptr 16.21.1	+
Ptr 10	+	7.4	-	77.4	-	Ptr 16.7.1	+	Ptr 16.21.2	+
Ptr 11	+	7.5	+	77.5	-	Ptr 16.7.2	+	Ptr 16.21.3	-
Ptr 16	+	12.1	-	77.6	+	Ptr 16.7.3	+	Ptr 16.22.1	+
Ptr 17	+	12.3	-	78.1	-	Ptr 16.8.1	+	Ptr 16.22.2	+
Ptr 18	+	27.1	+	78.2	-	Ptr 16.8.2	+	Ptr 16.22.3	+
Ptr 21	+	27.2	-	78.4	-	Ptr 16.8.3	+	Ptr 16.23.1	+
Ptr 22	+	27.5	-	79.1	+	Ptr 16.9.1	+	Ptr 16.23.2	+
Ptr 23	+	27.6	-	79.2	+	Ptr 16.9.2	+	Ptr 16.23.3	+
Ptr 24	+	27.7	+	79.6	-	Ptr 16.9.3	-	Ptr 16.24.1	+
Ptr 26	+	27.8	+	79.7	-	Ptr 16.10.1	+	Ptr 16.24.2	+
Ptr 34	+	27.11	-	79.8	+	Ptr 16.10.2	+	Ptr 16.24.3	-
Ptr 36	+	28.1	+	79.10	-	Ptr 16.10.3	+	Ptr 16.25.1	+
Ptr 37	+	28.2	-	80.1	-	Ptr 16.11.1	+	Ptr 16.25.2	+
Ptr 38	+	28.6	-	80.2	-	Ptr 16.11.2	+	Ptr 16.25.3	+
Ptr 42	+	28.8	-	80.3	-	Ptr 16.11.3	+	Ptr 16.25.4	+
Ptr 45	+	28.9	-	80.4	-	Ptr 16.12.1	+	Ptr TN 1.2	+
Ptr 46	+	37.1	-	80.5	-	Ptr 16.12.2	+	Ptr TN 1.5	+
Ptr 50	+	37.2	-	80.6	-	Ptr 16.12.3	-	Ptr TN 1.6	+
Ptr 51	+	37.3	-	81.1	+	Ptr 16.13.1	-	Ptr TN 1.9	-
Ptr 52	+	39.1	-	81.3	+	Ptr 16.13.2	+	Ptr TN 1.13	+
Ptr 53	+	39.2	-	81.4	+	Ptr 16.13.3	+	Ptr TN 2.1	-
Ptr 55	+	39.5	+	81.5	+	Ptr 16.14.1	+	Ptr TN 2.5	-
Ptr 56	+	41.4	+	82.1	+	Ptr 16.14.2	+	Ptr TN 2.7	-
Ptr 61	+	53.1	-	82.5	+	Ptr 16.14.3	+	Ptr TN 2.10	-
Ptr 62	+	53.2	-	82.6	+	Ptr 16.15.1	+	Ptr TN 2.11	-
Ptr 63	+	53.3	-	83.2	-	Ptr 16.15.2	+	I2.4	+
Ptr 64	+	68.2	-	Ptr 16.1.1	+	Ptr 16.15.3	+	I2.6	+
Ptr 65	+	68.3	-	Ptr 16.1.2	+	Ptr 16.16.1	+	I2.21	+
Ptr 66	+	68.4	-	Ptr 16.1.3	+	Ptr 16.16.2	+	I7.8	+
Ptr 67	+	71.3	-	Ptr 16.2.1	+	Ptr 16.16.3	+	I7.9	+
Ptr 68	+	74.4	-	Ptr 16.2.2	+	Ptr 16.17.1	+	5.3	+
Ptr 72	+	75.2	-	Ptr 16.2.3	-	Ptr 16.17.2	-	5.11	+
Ptr 73	+	75.3	-	Ptr 16.3.1	+	Ptr 16.17.3	-	13.13	-
Ptr 76	+	75.4	-	Ptr 16.3.2	+	Ptr 16.18.1	+	16.2	+
Ptr 77	+	75.5	+	Ptr 16.3.3	+	Ptr 16.18.2	+	16.5	+
Ptr 78	+	75.6	+	Ptr 16.4.2	+	Ptr 16.18.3	+	16.7	+
Ptr 79	+	75.7	+	Ptr 16.4.3	+	Ptr 16.19.1	+	90.2	-
Ptr 80	+	75.8	+	Ptr 16.5.1	+	Ptr 16.19.2	+		
Ptr 81	+	76.1	+	Ptr 16.5.2	+	Ptr 16.19.3	+		

(+) présence du gène, (-) absence du gène.

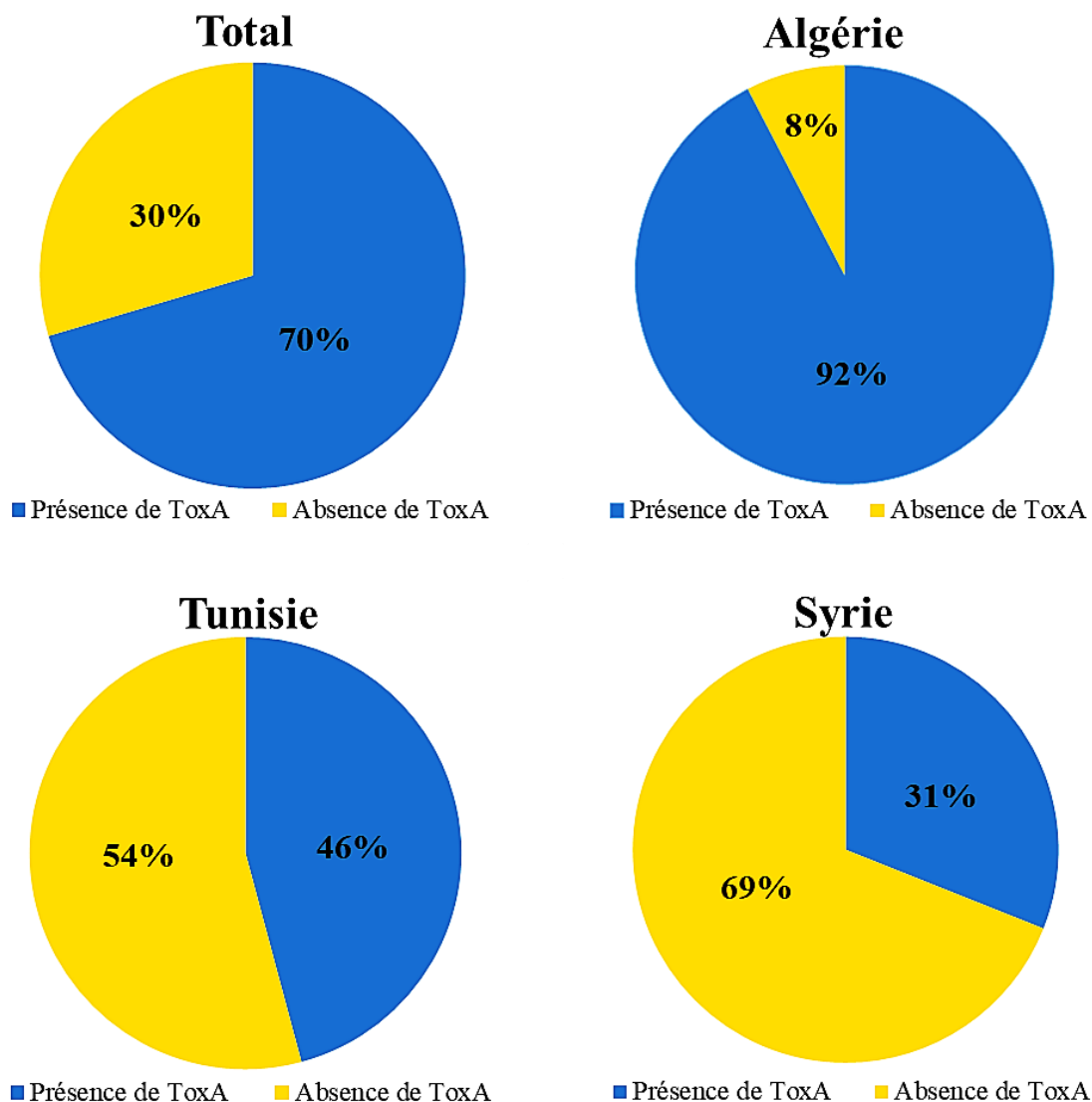


**Figure 26 :** Visualisation des produits d’amplification du gène ToxA sur gel d’agarose de 1,5 %.

Lors de la visualisation des produits d’amplifications sur gel d’agarose, les bandes observées ont présenté une intensité évidente chez la plus part des échantillons. Cependant, certains échantillons ont présenté des bandes d’intensité plus faibles, l’amplification de ces échantillons a été refaite, une à deux fois de plus, afin de s’assurer de la présence du gène.

Les résultats ont montré la présence du gène ToxA dans presque toutes les zones de culture du blé échantillonnées, que ce soit en l’Algérie, en Tunisie (l’Afrique du Nord) ou en Syrie (le Moyen Orient). Sur les 213 isolats testés, 150 isolats (70 %) contenaient le gène ToxA ; 121 (92 %) des 131 isolats prélevés en Algérie, 11 (46 %) des 24 isolats prélevés en Tunisie, et 18 (31 %) des 58 isolats prélevés en Syrie (Fig. 27). Le gène ToxA est plus fréquent chez les isolats du Nord de l’Afrique (85 %) que chez les isolats du Moyen Orient (31 %) (Fig. 27).

Les résultats obtenus suite à la recherche du gène ToxA par PCR, nous ont permis de suggérer les races auxquelles appartenaient les différents isolats. Ainsi, en considérant la présence du gène ToxA, les résultats indiquent que les isolats étudiés peuvent appartenir à la race 2 chez qui seule la toxine Ptr ToxA existe, à la race 1, à la race 7, ou encore à la race 8 chez qui la toxine Ptr ToxA est présente avec d’autres toxines (Ptr ToxB et/ou Ptr ToxC). Alors que l’absence de ce gène indique que les isolats peuvent appartenir aux races 3, 5 ou 6, chez qui uniquement les deux toxines Ptr ToxB et/ou Ptr ToxC existent, ou bien à la race avirulente 4 chez qui toutes les toxines sont absentes.



**Figure 27 :** Pourcentage de la présence du gène ToxA chez les isolats des trois pays.

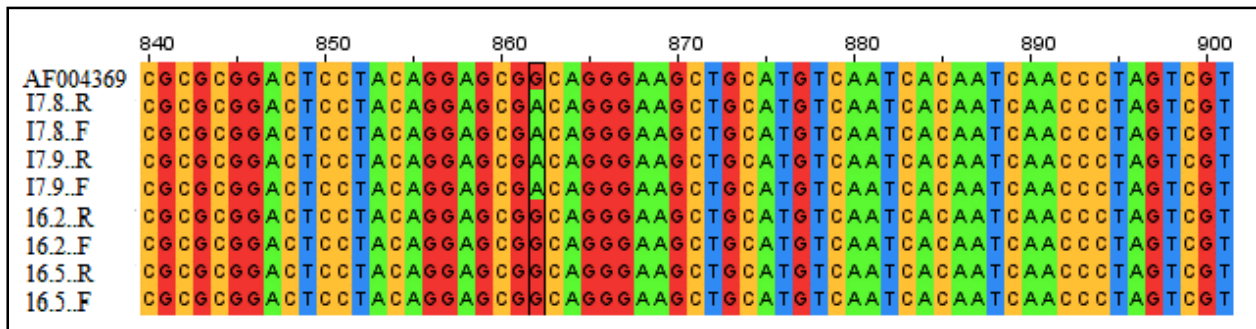
#### IV.7. Analyse des séquences des gènes ToxA chez les isolats sélectionnés.

Dans le but de rechercher la variation du gène de virulence ToxA, ce dernier a été séquencé dans sa totalité chez 25 isolats isolés à partir des trois pays ; Algérie (22), Tunisie (1) et Syrie (2). Le séquençage a été réalisé, par le Dr. Caroline MOFAT et son équipe au « Centre for Crop and Disease Management », Department of Environment and Agriculture, Curtin University, Australia. Il a concerné les deux brins ; le brin sens et le brin anti-sens.

Une première analyse des séquences obtenues a montré la présence d’une variation de ToxA, uniquement chez 2 isolats parmi les 25 analysés ; Il s’agit des isolats I7.8 et I7.9 provenant de la région de Blida en Algérie.

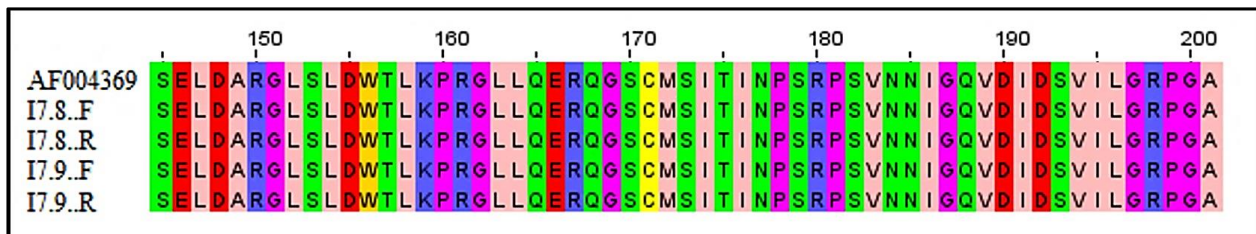
L’alignement des séquences obtenues pour ces deux isolats (Fig. 28) avec la séquence de référence du gène ToxA (AF004369), montre la présence d’une variation située à la position 862

pb du *locus* ToxA trouvée dans le génome des deux isolats. Il s'agit d'une substitution unique (G à A) située sur les deux brins d'ADN. Cette mutation est considérée comme silencieuse car elle induit une substitution du codon CGG par le codon CGA.



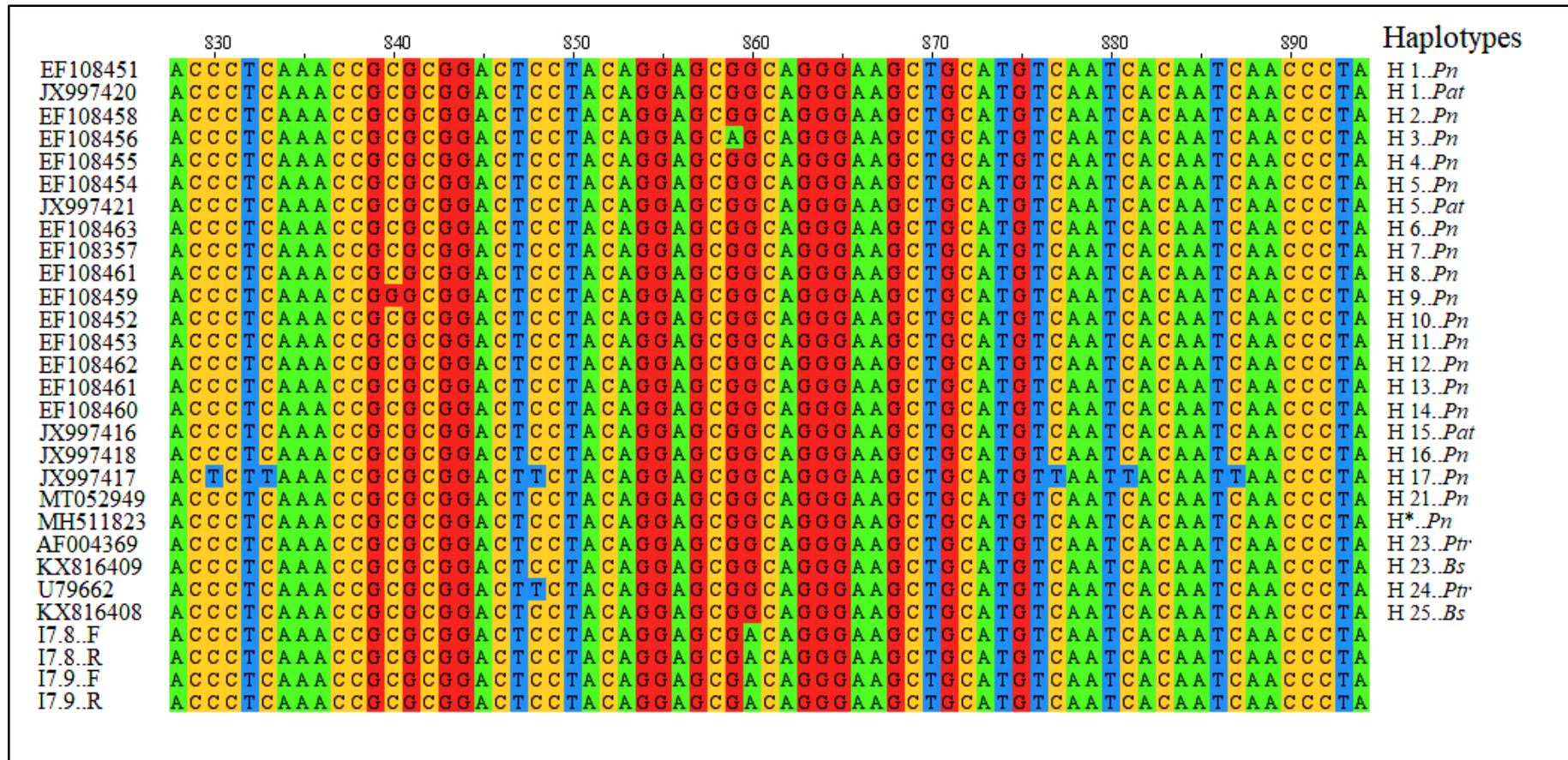
**Figure 28 :** Alignement des séquences du gène ToxA chez les isolats ayant montrés une variation (I7.8 et I7.9) au niveau du nucléotide 862, celles de deux isolats sans variations de ToxA (16.2 et 16.5) et la séquence de référence de ToxA (AF004369).

La traduction des séquences précédentes via le programme Jalview, montre en effet à la position 180, l'acides aminé Arginine (R) au niveau des séquences du polypeptide correspondantes, chez les deux isolats I7.8 et I7.9 (Fig. 29).



**Figure 29 :** Alignement des séquences polypeptidiques correspondantes à la toxine Ptr ToxA, traduites à partir des séquences variantes par rapport à la séquence de référence (AF004369).

Par ailleurs, l'alignement des séquences variantes du gène ToxA avec les haplotypes de ce gène déjà retrouvés chez *P. tritici-repentis*, ainsi que ceux retrouvés chez les espèces ; *Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedvl., Verkley & Crous, *P. avenaria tritici* (A.B. Frank) Quaedvlieg, Verkley & Crous, et *B. sorokiniana Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, montre que l'haplotype identifié chez les deux isolats algériens est nouveau (Fig. 30). Aucun haplotype connu jusqu'aujourd'hui chez *P. tritici-repentis*, ni chez les espèces apparentées ne correspond à la variation découverte à la position 862 du gène ToxA.



**Figure 30 :** Alignement des séquences du gène ToxA retrouvées chez les espèces *P. nodorum* (EF108451 ; EF108458 ; EF108456 ; EF108455 ; EF108454 ; EF108463 ; EF108457 ; EF108461 ; EF108459 ; EF108452 ; EF108453 ; EF108462 ; EF108460 ; EF108460 ; JX997418 ; JX997417 ; MH511823) ; *P. avenaria tritici* (JX997420 ; JX997421) ; *Pyrenophora tritici-repentis* (AF004369 ; U79662) ; *Bipolaris sorokiniana* (KX816408 ; KX816409) et celles retrouvées chez les deux isolats algériens ayant montré une variation de séquence (I7.8 et I7.9), mettant en évidence les différents haplotypes rapportés par rapport à l'haplotype découvert chez les isolats algériens I7.8 et I7.9.

Toutefois la substitution unique (G à A) a été décrite auparavant, mais située à la position 856 du locus ToxA trouvée dans l'haplotype H3 chez l'espèce *P. nodorum*.

## **Discussion**

A notre connaissance c'est la première étude de la variation du gène de virulence ToxA en Algérie et la deuxième en Afrique du Nord.

La modification de la méthode classique, a permis avec succès l'extraction de l'ADN de qualité et quantité satisfaisantes, ayant permis les amplifications effectuées. Lors d'une étude menée sur du sang congelé, Ahmed *et al.* (1995) ont aussi utilisé la protéinase K, et ont signalé une augmentation du rendement total ainsi qu'une meilleure pureté de l'ADN extrait. Leurs résultats ont indiqué que la protéinase K favorise le processus de déprotéinisation. De même, Rohland et Hofreiter (2018) lors d'une étude de comparaison de différentes méthodes d'extraction d'ADN, ont montré que la méthode d'extraction avec l'utilisation de la protéinase K était la plus performante en termes de rendement d'ADN tel que la révélée la quantification réalisée par PCR quantitative. Ils ont montré également que l'activité de la protéinase K est favorisée beaucoup plus dans le cas d'une extraction à partir de poudre fine.

L'amplification du gène ToxA, responsable de la synthèse de la toxine Ptr ToxA, a montré que plus de 70 % des isolats analysés possèdent le gène ToxA dans leur génome. Ce qui révèle la prédominance de ce gène, et par conséquent la prédominance des races possédant ce gène dans ces régions ; à savoir la race 1, la race 2, la race 7 et la race 8.

En Afrique du Nord, la structure des races de *P. tritici-repentis* a été étudiée, ces travaux ont montré que les isolats produisant la Ptr ToxA, seule ou en combinaison avec la toxine Ptr ToxB, sont prédominants dans les champs algériens et tunisiens (Benslimane *et al.*, 2011 ; Kamel *et al.*, 2019), ils sont cependant rares au Maroc (Gamba *et al.*, 2017). En Syrie, l'analyse de la présence des gènes ToxA et ToxB par PCR a montré que plus de 50 % des isolats possédaient le gène responsable de la production de la toxine Ptr ToxA (Benslimane *et al.*, 2014a). De même la présence du gène ToxA recherché par PCR a révélé que plus de 82 % des isolats possédaient le gène en Algérie parmi 55 isolats étudiés (Benslimane, 2012), et 51 % en Tunisie parmi 73 isolats étudiés (Kamel *et al.*, 2019).

La prédominance des isolats possédant le gène ToxA a été également rapporté au niveau mondial. En Europe, une étude menée sur 231 isolats a montré la sa présence chez 83 % des isolats provenant des pays Baltes et de Roumanie (Abdullah *et al.*, 2017a). Aux Etats Unis, Abdullah *et al.* (2017b) ont montré la présence du gène ToxA chez les isolats du Dakota du Sud



avec 86.2 %, 93.8 % et 88.3 % des isolats collectés en 2012, 2013 et 2014 respectivement. Au Canada, le gène ToxA a été mis en évidence chez 44 (98 %) des 45 isolats testés provenant de la région d'Alberta (Aboukhaddour *et al.*, 2013).

L'analyse de la diversité des séquences du gène ToxA, sur 25 isolats choisis dans les populations de *P. tritici-repentis* provenant des trois pays, qui ont fait objet de cette étude, a révélé une seule variation de séquence. Elle a été localisée à la position 862 pb du locus ToxA, chez les génomes de deux isolats I7.8 et I7.9 provenant des zones de culture de blé en Algérie, échantillonnés à Blida. L'haplotype retrouvé chez ces deux isolats est nouveau, non identifié auparavant.

Les haplotypes déjà découverts chez *P. tritici-repentis* sont peu nombreux ; en effet sur un total de 26 haplotypes du gène ToxA détectés chez les différentes espèces pathogènes agents causaux des taches foliaires au niveau mondial, 22 haplotypes (H1 jusqu'à H21 et H\*) ont été retrouvés chez l'espèce *Parastagonospora nodorum* (Friesen *et al.*, 2006 ; Stukenbrock et McDonald, 2007 ; McDonald *et al.*, 2013 ; Kamel *et al.*, 2019 ; Ghaderi *et al.*, 2020 ; Hafez *et al.*, 2020). L'haplotype H\* a été identifié *in silico* dans un isolat de *P. nodorum* originaire d'Australie (Kamel *et al.*, 2019).

Ainsi, chez *P. tritici-repentis*, seuls trois haplotypes de ToxA précédemment désignés (H14, H15 et H16) ont été identifiés. L'haplotype H16 a été signalé chez l'isolat canadien 86-124 (Ballance *et al.*, 1996), alors que l'haplotype H15 était présent chez l'isolat Pt-1c collecté aux Etats-Unis (Ciuffetti *et al.*, 1997). Enfin l'haplotype H14 a été trouvé chez 54 isolats originaires d'Europe, d'Amérique du Nord et d'Amérique du Sud (Friesen *et al.*, 2006). Récemment H23 (précédemment H15) a été le seul haplotype signalé dans les isolats de *P. tritici-repentis* de la province d'Alberta au Canada et de Tunisie (Kamel *et al.*, 2019).

Si les haplotypes du gène ToxA ont été relativement bien explorés chez *P. nodorum* (Friesen *et al.*, 2006 ; Stukenbrock et McDonald, 2007 ; McDonald *et al.*, 2013 ; Hafez *et al.*, 2020 ; Ghaderi *et al.*, 2020), il l'est moins pour l'espèce étudiée. En Algérie, à notre connaissance, il s'agit de la première analyse des haplotypes de ce ToxA chez *P. tritici-repentis*, et la deuxième en Afrique du Nord après une première effectuée par Kamel *et al.* (2019) en Tunisie. L'haplotype retrouvé chez les isolats algériens est nouveau, jamais décrit au paravent.

Par ailleurs chez l'espèce *P. avenaria tritici*, trois haplotypes, H1, H5 et H15, ont été identifiés jusqu'à présent (McDonald *et al.*, 2013 ; Ghaderi *et al.*, 2020).

Récemment, un homologue du gène ToxA a été signalé chez 35 isolats de *B. sorokiniana* provenant d'Australie (McDonald *et al.*, 2018). L'analyse de la séquence de Bs ToxA a révélé

deux haplotypes, l'un était identique à celui connu chez *P. tritici-repentis* (H23), et l'autre différait par une seule mutation non synonyme (C→G en position 412) et était unique à *B. sorokiniana*. En Inde, deux haplotypes de Bs ToxA H23 et/ou H25, ont été détectés chez 70 % des isolats analysés (Navathe *et al.*, 2019). Ces deux haplotypes étaient similaires aux deux haplotypes présents dans les isolats de *B. sorokiniana* provenant d'Australie et des États-Unis (McDonald *et al.*, 2018 ; Friesen *et al.*, 2018).

Les différents haplotypes du ToxA décrits à ce jour chez les quatre espèces pathogènes agents des taches foliaires des céréales (*P. nodorum*, *P. avenaria tritici*, *P. tritici-repentis* et *B. sorokiniana*), ont été utilisés pour illustrer le schéma évolutif de ces espèces (Hafez *et al.*, 2020).

Depuis la découverte du ToxA dans le génome de *P. nodorum*, l'origine évolutive de ce gène est devenu un sujet très attractif pour de nombreux chercheurs (Friesen *et al.*, 2006 ; Stukenbrock et McDonald, 2007 ; Ciuffetti *et al.*, 2010 ; Manning *et al.*, 2013). À ce jour, *P. nodorum* reste l'espèce présentant la plus grande diversité de séquences ToxA connue. Cette diversité soutient l'hypothèse selon laquelle le ToxA a eu plus de temps pour accumuler des mutations, et montre ainsi que ce gène existait depuis beaucoup plus longtemps dans le génome de cet organisme (Friesen *et al.*, 2006 ; Stukenbrock et McDonald, 2007).

Les 22 haplotypes connus jusqu'à présent chez *P. nodorum*, et l'absence de variations connues chez l'espèce *P. tritici-repentis* à l'époque, ont permis de suggérer une introduction très récente de ToxA dans le génome de *P. tritici-repentis* (Friesen *et al.*, 2006 ; Stukenbrock et McDonald, 2007).

Toutefois, Friesen *et al.* (2006) et Oliver et Solomon (2008) ont supposé que le gène ToxA a été transféré à partir d'une troisième espèce non encore découverte, sans être en mesure d'identifier d'autres donneurs possibles. Plus récemment, McDonald *et al.* (2017) ont signalé que *B. sorokiniana*, pathogène de l'orge et du blé principalement, isolé à partir du blé australien, possédait une région de 12 kb homologue au locus ToxA, qui est presque identique à la région de 11 kb commune, chez *P. tritici-repentis* et *P. nodorum*. On se basant sur la séquence du ToxA identique partagée entre le *P. tritici-repentis* et un haplotype de *B. sorokiniana*, McDonald *et al.* (2017) ont suggéré que ces régions partageaient une origine évolutive plus proche l'une de l'autre, que de *P. nodorum*. La présence du gène ToxA chez *B. sorokiniana* a été également rapportée par Friesen *et al.* (2018) chez des isolats américains.

Ce transfert a été soutenu par certaines observations sur le terrain dans les champs de blé. En fait, une infection mixte des pathogènes du blé sur la même feuille peut se produire ; la présence des deux pathogènes *P. nodorum* et *P. tritici-repentis* a été signalée plusieurs fois. De même que

Duveiller *et al.* (2005), ont montré qu'en Asie centrale la maladie de l'helminthosporiose est décrite comme un complexe de maladies composée à la fois de *B. sorokiniana* et de *P. tritici-repentis*. McDonald *et al.* (2017) a suggéré que cette association étroite offre clairement la possibilité à ces différents agents pathogènes de se rencontrer et d'échanger potentiellement leur ADN. La possibilité d'un échange génétique entre les espèces par anastomose entre les tubes germinatifs, a été suggéré (Roca *et al.*, 2005).

Notre étude focalisée sur les populations pathogènes d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient, a montré que le gène ToxA n'est pas complètement conservé ; la variation constatée à partir des isolats algériens nous a permis de supposer que d'autres variations pourraient être mises en évidence à l'avenir. Ces zones n'ont pas encore été suffisamment étudiées, même si une importante variation du pathogène a été signalée. En effet en Afrique du Nord, et selon la structure des races des populations analysées de cet agent pathogène, Kamel *et al.* (2019) ont signalé la présence de 4 races (2, 4, 5 et 7) trouvées parmi 72 isolats d'origine tunisiens ; Gamba *et al.* (2017) ont signalé la présence de 4 races (1, 5, 6 et 7) parmi 135 isolats d'origine marocains, et enfin, Benslimane *et al.* (2011) ont signalé la présence de 6 races (1, 4, 5, 6, 7 et 8) trouvées parmi seulement 55 isolats en Algérie.

Certaines données révélées en rapport avec les génomes, notamment celui de *P. tritici-repentis* laisse envisager la variabilité de ToxA. Dans une large comparaison des génomes de Dothideomycètes, tout le mécanisme à l'origine de l'induction du polymorphisme répété (RIP= repeat-induced-polymorphism) a été retrouvé, celui-ci est présent chez les trois espèces précédentes (Friesen *et al.*, 2006 ; Ohm *et al.*, 2012). Récemment, McDonald *et al.* (2019) ont fait la première description de ToxA avec des fonctions de transposon complètes. Selon cette découverte, il existe chez les trois espèces, une grande région génomique (140 à 250 kb) riche en transposons comportant ToxA ; elle a été nommée ToxhAT, absente chez les isolats qui ne portent pas ce gène.

La recombinaison intrachromosomique est également un mécanisme possible pour générer les polymorphismes observés. Dans de nombreux organismes modèles, tels que la drosophile et les levures, il a été déjà constaté que les délétions importantes étaient facilitées par la recombinaison entre des séquences répétées disposées en tandem (Kuttler et Mai, 2007 ; Gonzalez et Petrov, 2012). Ce mécanisme est particulièrement intéressant dans le contexte du transfert horizontal de gènes, car ces événements de recombinaison entraînent souvent la formation d'ADN extrachromosomique circulaire (Moller *et al.*, 2015, Mourier, 2016).

Aboukhaddour *et al.* (2009) ont observé un réarrangement chromosomique impliquant une translocation de ToxA vers un autre chromosome ; ils ont montré que chez au moins un isolat, ToxA se trouvait sur un chromosome différent de son emplacement chez l'isolat de référence 1C-BFP. Allant de ça, McDonald *et al.* (2019), ont considéré qu'il est probable que le ToxhAT ou un segment chromosomique plus important a été transféré, comme cela a été observé chez *B. sorokiniana*. Ainsi, les régions codantes individuelles trouvées au niveau de ToxhAT, semblent faire partie d'éléments répétitifs chez d'autres Dothideomycètes. Toutefois, ces auteurs n'ont pas pu statuer sur l'espèce chez qui ToxhAT, aurait pu être assemblé en une seule unité, avant le transfert horizontal entre ces trois agents pathogènes du blé. Ils ont tous de même rapporté que le transfert de ToxhAT entre *P. tritici-repentis* et *P. nodorum* s'est produit via une grande séquence (80 kb), qui subit actuellement une importante décomposition, alors que chez *B. sorokiniana*, le ToxhAT est mobile à l'intérieur du génome.

La caractérisation des répétitions terminales inversées (terminal inverted repeats : TIR) conservées de 74 pb dans les trois espèces, suggèrent fortement que ToxhAT a eu une seule origine évolutive dans les trois espèces (McDonald *et al.*, 2019).

Il a été démontré précédemment que le ToxA joue un rôle dominant dans les maladies du blé causées par *P. nodorum*, *P. tritici-repentis* et *B. sorokiniana* (Liu *et al.*, 2006 ; McDonald *et al.*, 2017). L'intérêt des auteurs pour ceci est dû au fait que (i) des données montrent que le gène codant pour la toxine produite, est intégré dans un "élément de pathogénicité" (pathogenicity element) très mobile, qui facilite la maladie du blé résultants de trois champignons pathogènes d'importance mondiale. (ii) de manière plus pratique, la connaissance intime de l'interaction gène-pour-gène permet d'apporter des changements immédiats aux stratégies de gestion des maladies.

Bien que les origines évolutives de ce gène et les mécanismes facilitant son transfert vers de multiples agents pathogènes du blé restent des questions ouvertes intrigantes, la prévention des pertes des rendements est indispensable. Pour ceci le retrait de la *Tsn1* des blés cultivés dans les cas de maladies pareilles et dans des régions stratégiques, comme l'Afrique du Nord et le Moyen orient, est préconisé, et aura un effet positif sur la sécurité alimentaire mondiale.

En Algérie, où la variation des séquences ToxA est identifiée et un complexe de race a été signalée, des génotypes de blé aux origines génétiques diverses sont cultivés dans les champs, pour des essais de sélection et de rendement. Il s'agit notamment de nouveaux cultivars, qui ont exercé une pression de sélection pour maintenir divers facteurs de virulence chez les agents pathogènes. Ceci est à l'origine d'apparition probable de mutations dans les gènes de virulence,

permettant aux agents pathogènes de surmonter la résistance de l'hôte. Par conséquent, la veille continue des modifications des gènes de virulence est importante pour déterminer si des pressions évolutives sont en jeu.

Cette situation dans les cultures de blé est souvent absente dans d'autres régions du monde où de grandes populations pathogènes ont été analysées, comme l'Amérique du Nord, l'Australie ou l'Europe. En fait, ces régions sont plus connues pour leurs génotypes homogènes cultivés sur de grandes superficies, dans le cadre d'un système de culture intensif.

En outre, l'Algérie est proche du centre d'origine du blé, qui est par définition les régions où est rencontré la plus grande variabilité chez une espèce végétale (Harlan, 1987 ; Vavilov, 1951) ; elle fait partie de la région méditerranéenne qui est reconnue et cartographiée par Vavilov (1951) comme un centre de diversité du blé dur. A cet effet, l'Algérie est une zone qui doit être considérée comme une source potentielle de variation de ce champignon.

#### **IV.8. Identification des races des isolats ayant montré une variation de ToxA**

Les réactions des cinq génotypes de blé composant la gamme différentielle modifiée, et utilisée à l'égard des 2 isolats I7.8 et I7.9, sont rapportées au niveau du tableau XVI. L'appartenance de chacun des deux isolats aux différentes races est indiquée également.

Après 24 h d'incubation à humidité continue, il a été possible de confirmer la réussite de l'inoculation exprimée par les premières lésions observées sur les feuilles des plantules inoculées. Ces lésions se présentent sous forme de taches de dimensions très réduites, de couleur verte plus foncée que celles du feuillage, représentant les zones de pénétration du champignon. Les symptômes du tan spot ont pu être observés dès le troisième jour après l'inoculation ; leur notation et la détermination des races ont été effectuées après sept jours d'incubation.

Les symptômes observés sont au nombre de deux (Fig. 31). Un premier type représente la réaction de sensibilité, exprimé chez Glenlea et Coulter, le second représente la réaction de résistance, observé chez Salamouni, 6B365 et 6B662 sous forme de nécroses de tailles très réduites de couleur marron foncé ou noir.

Les deux souches de référence Pti2 et DW7 utilisées comme témoins ont induit à chaque inoculation les symptômes attendus représentant respectivement les races 1 et 5 (Fig. 31).

**Tableau XVI :** Réactions des cinq génotypes de la gamme différentielle modifiée à l'égard des 2 isolats et détermination des races correspondantes.

Isolate	Genotype					Races
	Salamouni	Glenlea	Coulter	6B662	6B365	
I 7.8	R	S (N)	S (N)	R	R	2
I7.9	R	S (N)	S (N)	R	R	2



**Figure 31 :** Profils de virulence de la race 2 représenté par les symptômes induits par les 2 isolats I7.8 et 7.9. **A :** Sensibilité du cultivar Glenlea ; **B :** Sensibilité du cultivar Coulter ; noter les lésions avec nécrose auréolée ; **C :** Résistance du cultivar 6B-365. **D :** Résistance du cultivar 6B-662 ; **E :** Résistance du cultivar Salamouni ; notez la présence de petites taches brunes à noires sur les feuilles.

## Discussion

Les résultats obtenus avec les deux profils de virulence (Tab. XVI), montrent que les 2 isolats inoculés, provenant tous les deux de la région de Blida, appartiennent à la race 2. C'est le premier rapport de la race 2 de *P. tritici-repentis* dans les zones céréalière en Algérie.

La race 2 n'a jamais été signalée auparavant dans les champs algériens, et la seule recherche antérieure liée à la distribution des races en Algérie a mis en évidence une structure de population très diversifiée, ayant compris la race 7 à Blida (Benslimane *et al.*, 2011). Les mêmes résultats ont révélé l'existence en Algérie de six races distinctes de ce pathogène, il s'agit des races 1, 4, 5, 6, 7 et 8.

Le déploiement de certaines races par rapport à d'autres est favorisé par plusieurs facteurs directement lié à la biologie du champignon. La nature homothalique du *P. tritici-repentis* réduit les chances de recombinaison et favorise le maintien pendant une longue période pour certaines races avant l'apparition d'autres. D'un côté épidémiologique, ce champignon a la capacité d'effectuer plusieurs cycles durant la même saison, par conséquent les races peuvent se reproduire de la même façon et avec un rythme équivalent (Benslimane, 2012).

En effet la race 1 est prédominante à travers le monde ; en Australie (Ali *et al.* 2006), en Amérique du Nord, au Moyen Orient et au Caucase (Lamari *et al.*, 1995 ; 1998), en Iran (Momeni *et al.*, 2014), et en Algérie (Benslimane *et al.*, 2011). Cependant, au cours des deux dernières décennies, plusieurs recherches ont montré que la race 2 est l'une des plus prédominantes au Canada, aux États-Unis, en Amérique du Sud, en Australie, en Iran, et dans le Caucase du Nord (Lamari *et al.*, 1998; Ali et Francl, 2003; Friesen *et al.*, 2005; Lamari *et al.*, 2005b; Engle *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2010; Lepoint *et al.*, 2010; Gamba *et al.*, 2012; Aboukhaddour *et al.*, 2013; Mikhailova *et al.*, 2014; Abdullah *et al.*, 2017b). Cela peut être expliqué par l'introduction accidentelle du gène *Tsn1*, qui confère la sensibilité à la Ptr ToxA, dans la plupart des génotypes de blé (Lamari *et al.*, 2005b).

La prédominance de la race 1 n'exclue pas complètement la possibilité pour les autres races et leur prévalence à faible fréquence a été rapportée (Lamari et Bernier, 1989b ; Ali *et al.*, 2003 ; Lamari *et al.*, 2003 ; Benslimane *et al.*, 2011 ; Sarova *et al.*, 2005).

En Afrique du Nord, il s'agit du deuxième rapport de la race 2 suite à une étude publiée par Kamel *et al.* (2019), qui a trouvé la race 2 en Tunisie à faible fréquence. Les mêmes résultats ont été trouvés pour cette race en Europe, dans le Caucase et en Asie (Abdullah *et al.*, 2017a ; Momeni *et al.*, 2014 ; Lepoint *et al.*, 2010 ; Lamari *et al.*, 2005a ; Sarova *et al.*, 2005). En Australie et en Nouvelle-Zélande une combinaison des deux races 1 et 2 est possible, cette

conclusion est basée sur la présence de ToxA mais pas de ToxB dans ces régions (Antoni *et al.*, 2010 ; Weith, 2015).

La race 2 est parmi les races de ce pathogène (avec la race 3 et 5) qui sont considérées comme les races de base, en raison du fait qu'elles sont capables de produire une seule toxine (Strelkov et Lamari, 2003). La race 2 est capable de produire uniquement la Ptr ToxA sous le contrôle du gène de virulence ToxA (Strelkov et Lamari, 2003).

En plus des 8 races connues, plusieurs études antérieures, ont fait état de la découverte d'isolats atypiques dans les populations du *P. tritici-repentis*. Ces isolats ont la capacité de provoquer une nécrose sur Glenlea, un génotype porteur de *Tsn1*, mais ne possèdent pas le gène ToxA (Ali *et al.*, 2010 ; Benslimane *et al.*, 2011 ; Mironenko *et al.*, 2015 ; Abdullah *et al.*, 2017a ; Kamel *et al.*, 2019 ; Mironenko *et al.*, 2019).

Par conséquent, le système blé-*P. tritici-repentis* est beaucoup plus complexe que ce qui est actuellement décrit dans la littérature, et beaucoup de travaux supplémentaires sont nécessaires pour caractériser ce pathosystème. La mutation trouvée au niveau des séquences du gène ToxA n'avait aucun effet sur la variation pathogénique des deux isolats. Ceci n'empêche pas que d'autres mutations peuvent être présentes dans les populations de ce pathogène. Elles peuvent ainsi causer des variations importantes au niveau des gènes, induisant la production possible d'autres toxines, et par conséquent d'autres races non encore caractérisées.

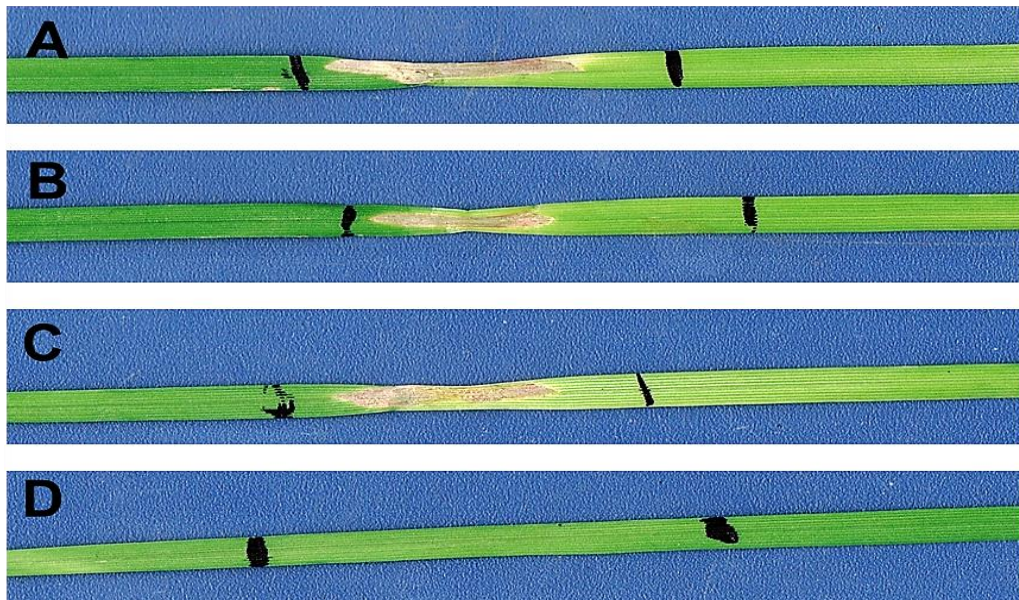
La classification des races en Afrique du Nord est difficile à attribuer uniquement à la géographie, mais le nombre de champs échantillonnés, les isolats récupérés et le nombre d'années d'échantillonnage restent toujours relativement faibles pour établir une conclusion finale. Un constat commun en Afrique du Nord, est l'absence de la race 3, un producteur de Ptr ToxC, dans cette région, et cette race cependant était la plus fréquente en Syrie (Lamari *et al.*, 2005b), toujours vraie à nos jours.

#### **IV.9. Réaction de la variété Glenlea au filtrat de culture des isolats mutés**

L'infiltration du filtrat de culture des deux isolats ayant montrés une variation au niveau du gène responsable ToxA ainsi que la souche de référence (Pti2) de la race 1 sur les feuilles de la variété Glenlea a été évaluée.

Toutes les feuilles du cultivar Glenlea infiltrées ont montré la réaction attendue ; développement d'une nécrose au niveau des zones infiltrées. Ceci est vraie aussi bien pour les deux isolats analysés, que pour l'isolat de référence (Pti2) (Fig. 32).





**Figure 32 :** Réaction du cultivar Glenlea aux filtrats de culture. **A et B :** Réaction aux filtrats des deux isolats I7.8 et I7.9 (race 2) ; **C :** Réaction aux filtrats de Pti2, isolat de référence de la race 1 (témoin positif) ; **D :** Réaction au milieu de culture Fries (témoin négatif).

Quelques heures après l’infiltration, la région concernée des feuilles du cultivar sensible Glenlea, apparaissait encore d’un vert plus foncé, indiquant une saturation des tissus par le filtrat de culture. Les symptômes de nécrose se sont développés dans les zones infiltrées (marquée par des traits noirs), puis la mort cellulaire était clairement visible dès le deuxième jour après l’infiltration. La notation a été effectuée après 5 jours d’incubation (Fig. 32.A et B). Le même symptôme a été observé lors de l’utilisation du filtrat de culture préparé à partir de l’isolat de référence Pti2 (race 1) (Fig. 32.C). En revanche, comme prévu, aucun symptôme n’a été observé chez les feuilles du même cultivar, quand elles ont été infiltrées par le milieu Fries (témoin négatif) (Fig. 32.D).

Toutes les feuilles de Glenlea ont développé une nécrose (sensibilité) lorsqu’elles ont été infiltrées avec les filtrats de culture fonfiques. La sensibilité au filtrat de culture indique la présence de la toxine Ptr ToxA active produite par les isolats I7.8 et I7.9 ; cela confirme que la variation de séquence nucléotidique rapportée, est une mutation silencieuse. Il a été démontré que les isolats de *P. tritici-repentis* qui sécrètent de la Ptr ToxA dans l’espace apoplastique des feuilles de blé infectées induisent la formation de lésions nécrotiques sur les cultivars qui sont sensibles à cette toxine (Lamari *et al.*, 1995 ; Ciuffetti *et al.*, 1997).

Les isolats ont été identifiés comme étant race 2, cette race est connue d’induire des nécroses uniquement ( $nec^+ chl^-$ ) (Lamari and Bernier, 1989b) par la production de la toxine Ptr ToxA (Friesen *et al.*, 2002 ) l’effecteur prédominant dans le pathosystème blé-*P. tritici-repentis*

(Friesen *et al.*, 2006). En outre, lors d'une étude menée par Lamari *et al.* (1995), seuls les isolats ayant induit une nécrose seule ou celle-ci associée à une chlorose ( $nec^+ chl^-$ ,  $nec^+ chl^+$ ), ont produit la toxine Ptr ToxA sur les feuilles du cultivar sensible «Glenlea».

Par ailleurs, les caractères analysés (croissance radiale et pouvoir de sporulation) (chapitres IV.3 et IV.4) ont montré que les isolats ayant montrés une variation, ne sont pas différents de ceux décrits précédemment pour lesquels aucune variation n'a jamais été rapportée dans le gène ToxA (Benslimane *et al.*, 2017).

#### **IV.10. Analyse de la réaction des blés à l'égard de la maladie du tan spot**

Dans cette étude, nous avons évalué la réaction de 116 génotypes de blé (25 lignées, 54 variétés locales et 37 cultivars) à l'égard des deux races 1 et 5 de *P. tritici-repentis*. L'évaluation de la réaction à la maladie, a d'abord été menée en chambre de culture au stade 2 à 3 feuilles. Ensuite, le matériel sélectionné résistant, a été évalué une seconde fois en chambre de culture avec 4 répétitions, et enfin évalué en plein champ pour confirmation. Cependant, en raison de la mauvaise qualité des graines des deux génotypes «MIKI 3» et «ADJINI», ces deux génotypes résistants ont été exclus lors de l'évaluation en plein champ.

Les deux cultivars de la gamme différentielle, utilisés comme témoins, ont montré à chaque fois les symptômes attendus après l'inoculation par les deux races 1 et 5. Le cultivar résistant Salamouni n'a pas montré de réponse visible au champignon après les trois premiers jours d'inoculation, bien que quelques petites taches brunes foncées à noires, typiques de la résistance, commençaient à se former sans réaction de nécroses ou de chloroses. Ceci était aussi vrai suite à l'inoculation par la race 1 que par la race 5 (Fig. 33). Le cultivar sensible Glenlea a également montré une réaction de résistance en développant de petites taches brunes foncées à noires typiques de la résistance à la race 5, tandis que sa sensibilité attendue à l'égard de la race 1 a été observée par le développement de taches nécrotiques sur ses feuilles (Fig. 33). La réaction standard de ces deux témoins résistant et sensible, est une assurance quant à la présence des conditions nécessaires et adéquates pour l'expression de la maladie.

##### **IV.10.1. Evaluation de la réaction à la maladie sous conditions contrôlées**

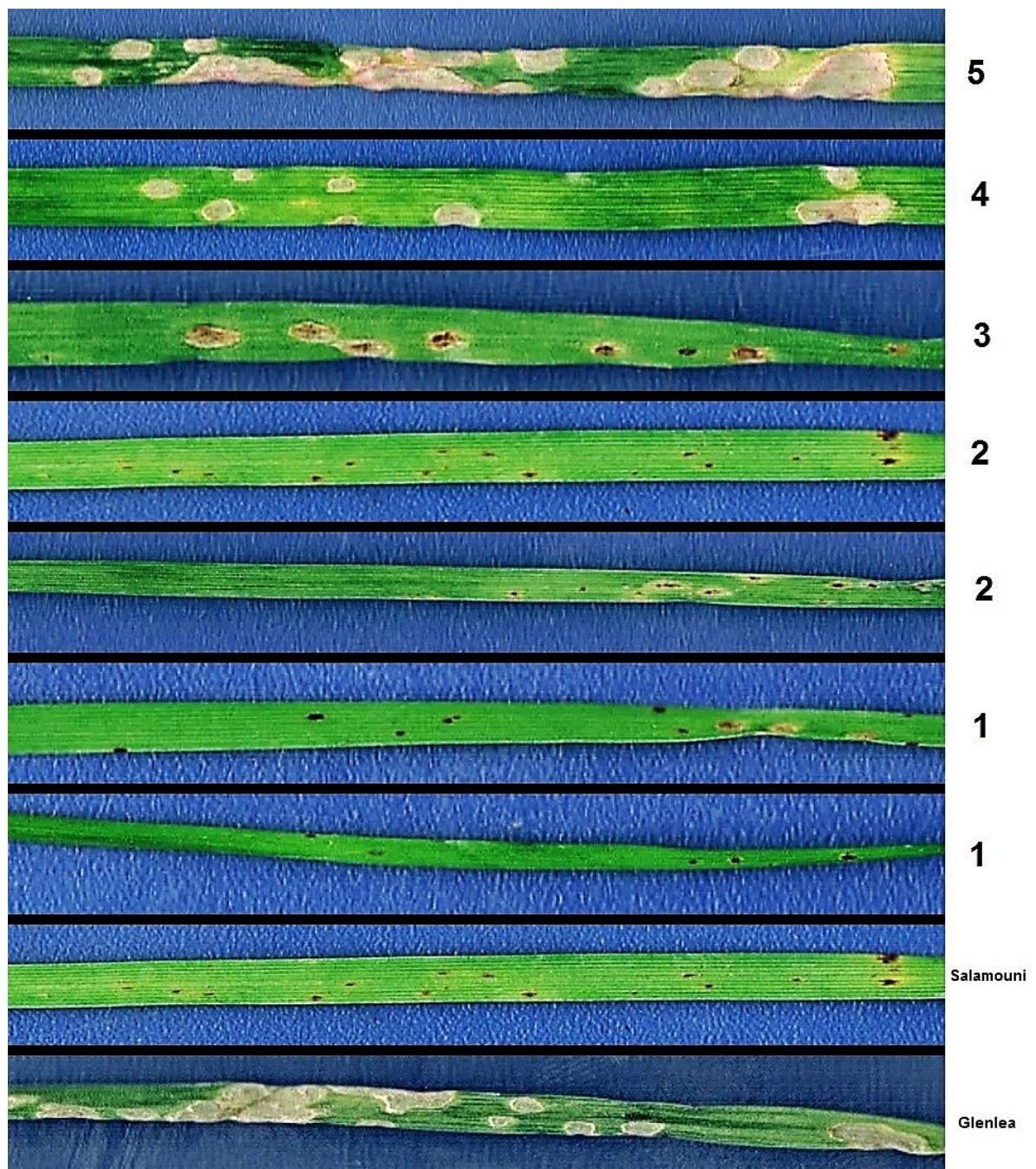
Après 24 h d'incubation sous humidité continue, il a été possible de confirmer la réussite de l'inoculation exprimée par les premières lésions observées sur les feuilles des plantules inoculées. Ces lésions se présentent sous forme de taches de dimensions très réduites, de couleur verte plus foncée que celles du feuillage, représentant les zones de pénétration du champignon. Les premiers symptômes sont apparus 3 jours après l'inoculation, l'observation et la notation des

symptômes se sont poursuivies, jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour. A ce moment, la réaction de chaque génotype a été évaluée.

Des différences significatives ont été révélées dans la réaction des génotypes de blé testées à l'égard du *P. tritici-repentis* en chambre de culture. La réaction de chaque génotype est indiquée en Annexe 17, tandis que les résultats des réactions sont résumés dans la figure 33 et le tableau XVII. A noter que, dans ce cas, la taille des lésions n'est pas prise en considération dans le système de notation adopté.

La comparaison des réactions des génotypes a été réalisée par le test Kruskal-Wallis, qui a mis en évidence une différence très hautement significative entre ces réactions ( $P= 0,000$ ) pour les deux races 1 et 5 (Annexe 18). L'analyse des résultats a montré que tous les types de réactions possibles (1, 2, 3, 4 et 5) ont été notés chez les génotypes testés ; résistante (R ; type de lésion 1) caractérisée par de petites taches de couleur marron foncé à noir et aucun halo jaunâtre. Modérément résistante (MR ; type de lésion 2), caractérisée par de petites tâches marron foncé à noir avec très peu de chlorose ou nécrose. Modérément sensible (MS ; type de lésion 4), caractérisée par de petites tâches marron foncé à noir entourées d'un halo chlorotique ou nécrotique distinct ; dans ce cas les lésions coalisaient. Une réaction intermédiaire entre les deux précédentes, est celle qualifiée de Modérément résistante/Modérément sensible (MR/MS ; type de lésion 3) ; elle est caractérisée par de petites tâches marron foncé à noir, entourées d'un halo chlorotique ou nécrotique distinct, les lésions ne coalisent pas. Et enfin, sensible (S ; type de lésion 5), caractérisée par la coalition des lésions en une seule zone nécrotique ou chlorotique (Fig. 33).

Ainsi, l'évaluation de la réaction des génotypes à l'égard de la race 1, a montré que la réaction de type modérément sensible (MS) était la plus rencontrée avec 58 sur 116 génotypes (50 %). Elle est suivie par la réaction de type sensible (S) avec 37 génotypes sur 116 testés (32 %), suivie par la réaction de type Modérément résistante/Modérément sensible (MR/MS) avec 8 génotypes (7 %), puis par la réaction de type résistante (R) avec 7 génotypes (6 %). Enfin, la réaction de type Modérément résistante (MR) avec seulement 6 génotypes (5 %) (Fig. 34).



**Figure 33 :** Types de réactions (type de lésions) observées sur les feuilles de blé à l'égard des races 1 et 5 de *P. tritici-repentis*. **Glenlea :** Témoin positif montrant la réaction de sensibilité à la race 1, exprimée par des nécroses ; **Salamouni :** Témoin négatif montrant la réaction de résistance aux deux races 1 et 5, exprimée par des taches noires de taille très réduite ; **1 :** Résistant ; **2 :** Modérément résistant ; **3 :** Modérément résistant/modérément sensible ; **4 :** modérément sensible ; **5 :** Sensible.

**Tableau XVII :** Types de réactions et nombre de géotypes pour chaque réaction, à l'égard des deux races 1 and 5 de *P. tritici-repentis*.

Race 1 (Pti2)				Race 5 (DW7)					
Type de lésion	Réaction	Nombre des géotypes		Total des géotypes	Type de lésion	Réaction	Nombre des géotypes		Total des géotypes
1	R	Lignées	1	7	1	R	Lignées	3	15
		Variétés	1				Variétés	3	
		Cultivars	5				Cultivars	9	
2	MR	Lignées	0	6	2	MR	Lignées	1	8
		Variétés	1				Variétés	2	
		Cultivars	5				Cultivars	5	
3	MR/MS	Lignées	0	8	3	MR/MS	Lignées	4	11
		Variétés	6				Variétés	4	
		Cultivars	2				Cultivars	3	
4	MS	Lignées	16	58	4	MS	Lignées	6	42
		Variétés	29				Variétés	28	
		Cultivars	13				Cultivars	8	
5	S	Lignées	8	37	5	S	Lignées	11	40
		Variétés	17				Variétés	17	
		Cultivars	12				Cultivars	12	

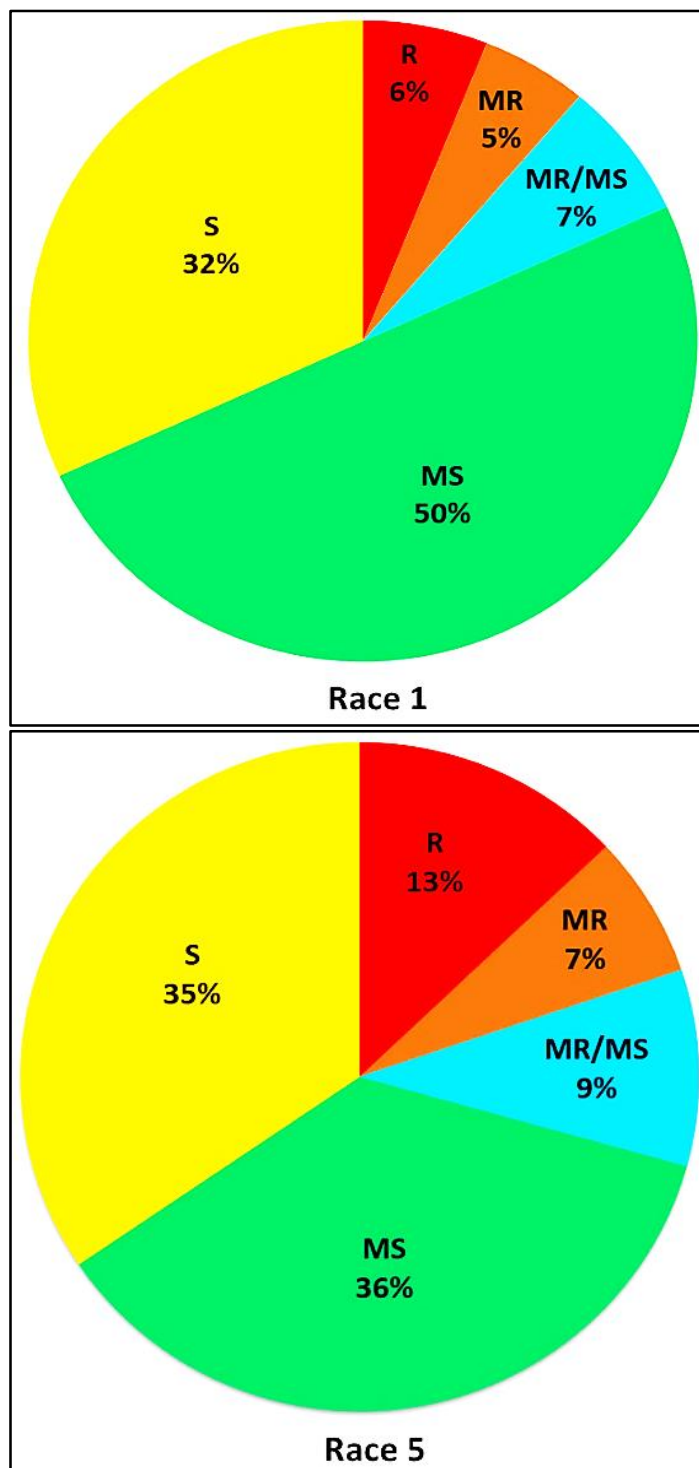
Par ailleurs, l'évaluation de la réaction des génotypes à l'égard de la race 5 a montré que la réaction de type modérément sensible (MS) était la plus retrouvée, avec 42 génotypes sur 116 (36 %). Elle est suivie par la réaction de type sensible (S) avec 40 génotypes sur 116 testés (35 %), puis par la réaction de type résistante (R) avec 15 génotypes (13 %), et la réaction de type Modérément résistante/Modérément sensible (MR/MS) avec 11 génotypes (9 %). Enfin, la réaction de type Modérément résistante (MR) avec seulement 8 génotypes (7 %) (Fig. 34).

Dans le cas des génotypes résistants, trois jours après l'inoculation, de petites taches de couleur brun foncé à noir sur le site d'infection, sans ou avec peu de chlorose, ont été observées autour du site d'infection. Six à huit jours après l'inoculation, ces taches sont restées de la même taille et/ou ont légèrement augmenté (type de lésions 1 et 2) (Fig. 33).

Cependant, les génotypes de blé sensibles présentaient des lésions nécrotiques, avec parfois une chlorose autour de la lésion, ce qui est typique de l'interaction positive hôte /pathogène (Fig. 33). Six jours après l'inoculation, ces lésions ont augmenté en taille. Huit jours après l'inoculation, chacun des génotypes sensibles a développé de grandes lésions coalescentes, typiques de la maladie de la tache auréolée, causées par les deux races 1 et 5, observées aussi bien chez le blé dur que le blé tendre (Fig. 33).

L'évaluation de la réaction des génotypes à l'égard de la race 1, a permis de sélectionner 13 génotypes (11 %), dont 1 lignée, 2 variétés locales et 10 cultivars, qui se sont montrés résistants à modérément résistants (type de lésion 1 et 2). Alors que 8 génotypes (7 %), dont 6 variétés locales et 2 cultivars, se sont montrés modérément résistants à modérément sensibles (type de lésion 3). Le reste des génotypes à savoir 95 (82 %), dont 24 lignées, 46 variétés locales et 25 cultivars, se sont montrés sensibles à modérément sensibles (type de lésion 4 et 5) (Fig. 33 et Tableau XVII).

L'évaluation de la réaction des génotypes à l'égard de la race 5, a permis de sélectionner 23 génotypes (20 %), dont 4 lignées, 5 variétés locales et 14 cultivars, qui se sont montrés résistants à modérément résistants (type de lésion 1 et 2). De même que la réaction de type modérément résistant à modérément sensible (type de lésion 3) a été déterminée chez 11 génotypes (9 %), dont 4 lignées, 4 variétés locales et 3 cultivars. Le reste des génotypes testés 82 (71 %), dont 17 lignées, 45 variétés locales et 20 cultivars, se sont montrés sensibles à la race 5 (type de lésion 4 et 5) (Fig. 33 et Tableau XVII).



**Figure 34 :** Pourcentages des génotypes notés pour chaque type de réaction.

Nous avons constaté que les génotypes évalués résistants, étaient plus représentés par les cultivars ; leur nombre est plus important que celui des variétés locales et des lignés. Il est de l'ordre de 10 (77 %) et 14 (61 %) cultivars résistants à l'égard des deux races 1 et 5 respectivement. De même les variétés locales ont été les plus rencontrées parmi le matériel

végétal évalué comme sensible : leur nombre est de 46 et 45 variétés pour les races 1 et 5 respectivement ; soit 48 % et 55 % de l'ensemble des génotypes sensibles.

Enfin, l'analyse des réactions a montré que parmi les 116 génotypes évalués, seulement 7 génotypes (1 variété locale et 6 cultivars), soit 6 %, sont résistants à la fois aux deux races 1 et 5, car ils ont développé une réaction correspondante au de type de lésion, 1 à 2 (tableau XVII). L'analyse a également montré que parmi tous les génotypes testés, 72 génotypes (17 lignées hybrides, 42 variétés locales et 13 cultivars) soit 62 %, sont sensibles à modérément sensibles à la fois à ces deux races ; ils ont développés des types de lésion de 4 à 5.

Les résultats obtenus lors du test de confirmation de la réaction de résistance observée lors de la première évaluation en chambre de culture, moyennant 4 répétitions, ont montré exactement les mêmes réactions de résistance chez tous les génotypes concernés. Ceci est vrai pour la résistance à l'égard des deux races 1 et 5, aussi bien pour le type de lésion 1, que pour le type 2 (résistant et modérément résistante).

#### **IV.10.2. Evaluation de la réaction à la maladie en plein champs**

Les résultats obtenus sont synthétisés dans le Tableau XVIII, et illustrés par la figure 33. Les premiers symptômes n'ont été observés sur les plantes évaluées à l'égard des deux races 1 et 5 qu'après dix et quinze jours d'inoculation, respectivement. Il s'agit de petites taches brunes foncées à noires, parfois entourées d'une chlorose réduite, typiques des symptômes de résistance. Les résultats obtenus ont montré une différence remarquable du temps de réponse des génotypes inoculés par les deux races ; la réponse à la race 1 était plus rapide, elle s'est exprimée 10 jours après l'inoculation, tandis que la réponse à la race 5, s'est exprimée 15 jours après l'inoculation.

L'évaluation du pourcentage du feuillage sur lequel les lésions ont été observées, a montré qu'il n'excédait pas 20 %. Cette valeur n'a été enregistrée que chez quelques génotypes, en réaction à la race 1. Cependant, pour la plupart des génotypes, la surface des feuilles tachetées, a été de 5 à 10 % ; les valeurs sont restées les mêmes tout au long de la période d'évaluation (Tableau XVIII).

À la fin de nos observations, alors que les feuilles étaient encore vertes, la surface de feuilles malades variait de 5 à 20 %, dans les deux essais.



**Tableau XVIII :** Réactions des géotypes de blé à l'égard des deux races 1 et 5 de *P. tritici-repentis* en plein champ.

Géotype	10 jours		20 jours		30 jours		40 jours	
	post-inoculation		post-inoculation		post-inoculation		post-inoculation	
	Score <sup>a</sup>	SF (%) <sup>b</sup>	Score	SF(%)	Score	SF (%)	Score	SF (%)
<b>Réaction des géotypes à l'égard de la race 1</b>								
<b>4</b>	1	10	1	10	1 (2)	10	1 (2)	10
<b>26</b>	1	20	1	20	1	20	1	20
<b>98</b>	1	10	1	10	1	10	1 (2)	10
<b>99</b>	1	20	1	20	1 (2)	20	1 (2)	20
<b>103</b>	1	10	1	10	1 (2)	10	1 (2)	10
<b>107</b>	1	15	1	15	1	20	1	20
<b>Réaction des géotypes à l'égard de la race 5</b>								
<b>3</b>	1	5	1	5	1 (2)	10	1 (2)	10
<b>9</b>	1	5	1	5	1	5	2	10
<b>17</b>	1	5	1	5	1	5	1	5
<b>31</b>	1	5	1	5	1	10	1	10
<b>36</b>	1	5	1	5	1	5	1	5
<b>82</b>	1	5	1	5	1	5	1	5
<b>85</b>	1	5	1	5	1	5	1 (2)	5
<b>89</b>	1	5	1	5	1	10	1	10
<b>90</b>	1	5	1	5	1	10	1	10
<b>94</b>	1	5	1	5	1	5	1 (2)	5
<b>96</b>	1	5	1	5	1 (2)	5	1 (2)	10

<sup>a</sup> Le score selon le type de lésion.

<sup>b</sup> Pourcentage de feuilles infectées.

Nos résultats ont montré que les réponses des génotypes aux deux races 1 et 5 dans les conditions de terrain, étaient semblables à celles observées durant les essais en chambre de culture. Par conséquent, nous avons confirmé en plein champ, les sources de résistance à la tache auréolée identifiées en conditions contrôlées.

Enfin les résultats obtenus par le test Kruskal-Wallis, montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les réactions des différents génotypes, observées aux différentes dates de notation ( $P > 0,05$ ) (Annexe 19 et 20). Ceci est vrai, aussi bien pour les réactions à l'égard de la race 1, que celles à l'égard de la race 5. Cela confirme l'homogénéité des réactions de résistance obtenues du début jusqu'à la fin de l'essai.

## **Discussion**

Notre travail représente la première étude consacrée à la recherche des ressources de résistance à la maladie de la tache auréolée en Algérie.

L'étude d'évaluation de la maladie a d'abord été menée sur des plantules au stade 2 à 3 feuilles en chambre de culture, ensuite en plein champ pour les génotypes qui ont montré une résistance. L'inoculation de la plante en conditions contrôlées au stade que nous avons choisis, est souvent préféré ; ceci permet d'avoir des résultats plus rapides et fiables, et d'éliminer le matériel le plus sensible avant la confirmation de la résistance au champ (Singh *et al.*, 2012). Les résultats en conditions contrôlées peuvent être ainsi un indicateur utile lors des essais en plein champ (See *et al.*, 2018). Cet intérêt est d'autant plus important, que plusieurs travaux ont montré que la réaction des plantules de blé à la maladie de la tache auréolée en conditions contrôlées, est fortement corrélée à celle observée en plein champ (Evans *et al.*, 1999 ; Sarova *et al.*, 2002 ; Kalia *et al.*, 2018 ; See *et al.*, 2018 ; Dinglasan *et al.*, 2018). En outre, les contraintes de l'évaluation en plein champ sont nombreuses et influencent l'intensité des attaques, rendant ainsi l'évaluation compliquée. Elles sont en relation avec la technique d'inoculation utilisée, le complexe des maladies foliaires, le stade végétatif de la plante, l'organe inoculé et les conditions environnementales. Afin de diminuer ces contraintes, lors de l'essai en plein champs la réaction des génotypes de blé a été conduite au stade fin tallage début montaison ; ceci facilite l'infection des feuilles, et la dissémination de l'inoculum composé d'une suspension de spores.

La sélection à l'égard de la race 1 de *P. tritici-repentis*, est un choix basé sur le fait de sa prédominance dans le monde, notamment en Algérie où 41 % des isolats ont été retrouvés appartenir à cette race (Benslimane *et al.*, 2011). Elle est également, le représentant typique de la toxine Ptr ToxA ; principal facteur de virulence dans le pathosystème blé/*P. tritici-repentis*. De même notre intérêt de trouver des sources de résistance à l'égard de la race 5, trouve son

importance dans le fait que l'Algérie fait partie des rares régions du monde où elle a été identifiée ; cette race est reconnue et considérée comme une race de base, elle est le représentant typique de la toxine Ptr ToxB ; second facteur de virulence dans ce pathosystème.

Dans cette étude nous avons utilisé l'échelle de notation de la maladie largement acceptée ; de 1 à 5, elle est basée sur les types de lésions (Lamari et Bernier, 1989c), la taille de ces dernières telle recommandée par certains auteurs comme Dinglasan *et al.* (2016), n'a pas été prise en considération. En effet, dans la plus part du temps, la taille des lésions ne donne pas une estimation réelle de la sensibilité ou de la résistance de la variété. Elle est plutôt dépendante du nombre de spores ayant germées et infectées la feuille de blé. Elle peut être également le résultat du nombre de tubes germinatifs produits par chacune des spores ; une spore de *P. tritici-repentis* peut germer à partir de la cellule apicale, basale ou latérale, il peut y avoir également une germination de toutes les cellules. Ces faits sont très dépendant des conditions du milieu environnant.

Les observations réalisées sur les plantes inoculées ont permis de constater que comme prévu, les deux génotypes de blé de la gamme différentielle utilisés comme témoins ; Salamouni et Glenlea, ont développé des réactions typiques à l'égard des deux races 1 et 5. Ainsi, le cultivar Salamouni était résistant aux deux races ; il a été considéré comme une source de résistance à la tache auréolée et utilisé dans la gamme différentielle comme lignée totalement résistante à toutes les races de *P. tritici-repentis* (Lamari *et al.*, 1998). A l'opposé, Glenlea connue pour être sensible à la nécrose induite par la race 1 (Lamari *et al.*, 2003) et résistante à la race 5 (Orolaza *et al.*, 1995), a réagi par des nécroses de forme ovale à la première, et par des taches très réduites de couleur noir à la seconde. Ces réactions confirment la réussite de l'inoculation vérifiée déjà précédemment par l'observation des premières lésions sur les feuilles inoculées, après 24 h d'inoculation. Les symptômes observés ont été associé à la croissance mycélienne dans les tissus des feuilles de blé ; la croissance est en effet généralement limitée aux lésions aux premiers stades de la maladie, même lorsque la chlorose étendue a affecté presque toute la section de la feuille (Manning et Ciuffetti, 2015).

Les résultats obtenus montrent une corrélation entre la résistance au stade plantules en chambre de culture et celle exprimée en plein champ. Des résultats similaires ont été trouvés chez les variétés de blé de printemps américaines (Tadesse *et al.*, 2011).

Toutefois, bien que les réponses soient similaires, une différence remarquable du temps de réponse des génotypes inoculés par les deux races a été observée ; la réponse à la race 1 était plus rapide par rapport à la réponse à la race 5. Ceci trouverait son origine dans la vitesse

d'expression des deux toxines Ptr ToxA et Ptr ToxB, produites successivement par les deux races 1 et 5. Les résultats obtenus par Pandelova *et al.* (2012) ont rapporté que les réponses induites par la toxine Ptr ToxA, et donc le développement des symptômes, sont plus rapides et plus intenses que celles induites par la toxine Ptr ToxB. La différence de temps de réponse aux toxines pourrait être expliquée par des différences de perception, ainsi que par des différences d'activation d'un processus particulier, tel que la biosynthèse de l'éthylène chez la plante (Pandelova *et al.*, 2012). Selon Pandelova *et al.* (2012), des réponses plus lentes et dans certains cas des amplitudes plus faibles dans l'expression génique, conduisent à des changements biochimiques proportionnellement plus faibles chez les feuilles traitées à la Ptr ToxB. Ceux-ci, permettent à la plante de maintenir son homéostasie plus longtemps, et par conséquent, entraînent un développement des symptômes plus lent et moins grave (Pandelova *et al.*, 2012). Ciuffetti *et al.* (2010) ont également montré que les réponses de l'hôte induites par la Ptr ToxA, sont plus rapides et conduisent à une nécrose, tandis que les changements induits par ToxB sont plus lents et entraînent une chlorose.

Nos résultats mettent en évidence des réactions de résistance (type de lésion 1 et 2) chez plusieurs génotypes ; ce qui nous permet de recommander leur utilisation en culture. Cette utilisation devra prendre en considération la distribution des races de ce pathogène dans les champs algériens révélée par Benslimane *et al.* (2011). Nous avons pu également mettre en évidence d'autres génotypes qui pourraient être inclus dans les programmes de sélection, visant à réunir plusieurs caractéristiques souhaitables, notamment le rendement, l'adaptation aux conditions climatiques comme la tolérance à la sécheresse, la qualité des grains, les semis tardifs ou précoces, ainsi que la résistance à la tache auréolée.

À la lumière des résultats obtenus, nous recommandons les génotypes résistants 4, 26, 98, 99, 103, 111 et 114 avec type de lésion 1, et les génotypes modérément résistants 37, 106, 107, 109, 112 et 113 avec type de lésion 2, pour la culture dans les régions où la race 1 est très répandue à savoir Tipaza, Ain Defla, Médéa, Alger, Boumerdes, Bouira, Mila, Constantine et Annaba. Cependant, les génotypes résistants 3, 9, 17, 36, 38, 60, 82, 85, 89, 98, 99, 103, 108, 113 et 114 avec type de lésion 1, et les génotypes modérément résistants 18, 26, 31, 90, 94, 96, 100 et 107 avec type de lésion 2, doivent être utilisés en culture à Mila et Guelma, où la race 5 est retrouvée.

La sélection et l'utilisation de ces cultivars contre les deux races 1 et 5 devrait offrir une résistance suffisante pour minimiser les pertes dues à cette maladie dans les champs algériens. En effet, afin de surmonter la résistance de ce type de cultivars, le champignon devra produire une nouvelle toxine. De plus, une mutation inverse impliquant un gain de fonction dans la plante

hôte, permettant l'acquisition d'un récepteur spécifique de la nouvelle toxine, sera également nécessaire. La probabilité que les deux événements se produisent en même temps est peu probable (Singh *et al.*, 2010).

Par contre, les génotypes qui se sont montrés sensibles ou modérément sensibles à l'une des deux races, doivent être évités, ou au moins leur utilisation devrait être limitée, voir strictement interdits pour ceux qui sont sensibles à la fois aux deux races. Ceci est préconisé dans toutes les zones où les deux races ont été identifiées, en particulier lorsque les conditions favorables au développement de la tache auréolée sont réunies.

Les génotypes de blé résistants à la fois à la race 1 et à la race 5 (26, 98, 99, 103, 107, 113 et 114), peuvent être recommandés pour les régions où les races 6, 7 et 8 ont été signalées ; à savoir Mascara, Tipaza, Ain-Defla, Blida, Médéa, Alger, Boumerdes, Bouira, Tizi-Ouzou, Béjaïa (Benslimane *et al.*, 2011). Ils peuvent également être des sources de résistance et être utilisés pour développer de nouvelles lignées insensibles à deux ou trois gènes de virulence. Cela permet de réunir, l'insensibilité à deux ou trois facteurs de virulence Ptr ToxA, Ptr ToxB et Ptr ToxC, présents chez les races 6, 7 et 8.

Les différentes réactions des génotypes évalués (résistance/sensibilité) peuvent être expliquées par des données cytologiques rapportées dans la littérature et relatives au processus d'infection. De nombreuses études intéressantes ont examiné profondément la germination, la pénétration et la colonisation du *P. tritici-repentis* chez des génotypes de blé sensibles et résistants (Lamari et Bernier, 1989b ; Dushnicky *et al.*, 1998 ; Loughman et Deverall, 1986). Loughman et Deverall (1986) ont montré que chez un cultivar sensible, les hyphes intercellulaires émergent de façon plus étendue du site d'infection dans le mésophylle, et forme des mycéliums significativement plus grands que chez le cultivar résistant. La croissance intercellulaire rapide est ensuite poursuivie chez le cultivar sensible, mais pas chez le résistant. Les lésions nécrotiques s'étendent ainsi plus rapidement chez le cultivar sensible à partir du troisième jour. Lamari et Bernier (1989b) ont montré que la résistance à la maladie ne s'exprime qu'après l'invasion de l'espace intercellulaire du mésophylle par les hyphes fongiques. Ainsi, la différence de réaction entre les cultivars résistants et sensible n'est visible qu'après 48h.

La résistance observée dans le matériel végétal évalué, peut être expliqué par les interactions connues dans le pathosystème blé/*P. tritici-repentis*. En effet la sensibilité résulte de la présence chez l'hôte d'un récepteur spécifique, l'absence de ce récepteur conduirait à la résistance. De ce fait, la race 1 produit les deux toxines Ptr ToxA et Ptr ToxC et la sensibilité à ces deux gènes est régie par les gènes *Tsn1* et *Tsc1* situé sur les chromosomes 5B et 1AS respectivement (Faris *et*

*al.*, 1996 ; Anderson *et al.*, 1999 ; Effertz *et al.*, 2002). Alors que, la race 5 produit une seule toxine Ptr ToxB, et la sensibilité au gène responsable, serait régie par le gène *Tsc2* situé sur le chromosome 2BS (Friesen et Faris, 2004). La reconnaissance de ces toxines par les gènes correspondant, conduit à une interaction compatible exprimée par le développement de la maladie. Plusieurs études ont montré que ces interactions jouent toutes un rôle important dans le développement de la tache auréolée (Faris *et al.*, 2013 ; Kariyawasam *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2017).

Par ailleurs, les interactions Ptr ToxA-*Tsn1* et Ptr ToxC-*Tsc1* ont un effet additif sur l'expression de la maladie lorsque elles se produisaient simultanément (Kariyawasam *et al.*, 2018 ; See *et al.*, 2018 ; Liu *et al.*, 2017 ). Dans une étude récente, Liu *et al.* (2017) ont constaté que les lignées de blé portant un des deux gènes de sensibilité *Tsn1* ou *Tsc2*, étaient moins sensibles que celles portant les deux gènes. Ceci est conforme à ce qui est connu dans ce type de pathosystème ; selon Friesen et Faris (2010), dans le cas des pathogènes nécrotrophes, la partie des interactions basée sur le modèle inverses du « gène pour gène », ont souvent un effet additif et produisent des différences quantitatives dans le développement de la maladie et les réponses de résistance.

Dans certain cas, l'interaction Ptr ToxA-*Tsn1* ne joue que peu ou pas de rôle dans le développement de la tache auréolée, tel qu'il a été rapporté chez le blé dur par Viridi *et al.* (2016). De même, certains travaux décrivent des génotypes sensibles à la race 1 mais insensibles à la toxine Ptr ToxA (Abdullah *et al.*, 2017), et d'autres sensibles à la race 5 mais insensibles à la toxine Ptr ToxB de *P. tritici-repentis* (Abeysekara *et al.* 2010). Les auteurs suggèrent ainsi, l'existence d'autres facteurs affectant la maladie en plus de l'interaction citée dans le paragraphe précédent. L'hypothèse, est que d'autres récepteurs protéiques non encore découverts pourraient être impliqués ; la différence entre sensibilité/insensibilité, résiderait dans la capacité des génotypes à laisser pénétrer ces toxines dans leur cellules (Manning et Ciuffetti, 2005 ; Faris *et al.*, 2013). Faris *et al.* (2010), ont suggéré que l'insensibilité à la Ptr ToxA peut être due à l'incapacité des génotypes de la reconnaître, à la suite d'une mutation ou une inactivation du gène *Tsn1*.

La résistance/sensibilité des génotypes notés dans le présent travail peut avoir une autre origine. Manning et Ciuffetti (2015), ont prouvé que le développement des symptômes causés par la Ptr ToxA était épistatiques. Ils ont apporté des données qui suggèrent que l'expression de la Ptr ToxA peut masquer l'expression des symptômes induits par d'autres toxines, au moins dans certains génotypes de blé (Manning et Ciuffetti, 2015). Ceci semble plus vraisemblable, du fait

que le déclenchement du gène de sensibilité *Tsn1* dans certains génotypes, entraîne la suppression d'autres réponses géniques de type résistance, qui peuvent être nécessaires à l'expression d'autres symptômes induits (Manning et Ciuffetti, 2015).

L'analyse de l'interaction Ptr ToxB-*Tsc2* a également montré que celle-ci, peut jouer un rôle important dans le développement de la sensibilité aux isolats de la race 5 de *P. tritici-repentis* (Abeysekara *et al.*, 2010 ; Viridi *et al.*, 2016). Le principal locus de sensibilité au produit de ToxB, le gène *Tsc2*, a été cartographié sur le bras court du chromosome 2B (Friesen et Faris, 2004 ; Abeysekara *et al.*, 2010). Sa fréquence dans les génotypes d'une région géographique, peut refléter fortement la présence d'isolats *P. tritici-repentis* portant le gène ToxB, (Corsi *et al.*, 2020).

Enfin, dans la troisième interaction Ptr ToxC-*Tsc1*, le rôle de la toxine Ptr ToxC dans le développement de la maladie n'a pas été bien étudié, sauf pour quelques études à travers lesquelles des QTL ont été mis en évidence, et qui ont suggéré leur important rôle (Faris *et al.*, 1997 ; Effertz *et al.*, 2001, 2002 ; Sun *et al.*, 2010 ; Kariyawasam *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2017). Ainsi, cette importance a été décrite dans le cas du blé tendre (Faris *et al.*, 2013 ; Liu *et al.*, 2017 ; Kalia *et al.*, 2018), mais elle n'a pas encore été évaluée pour le blé dur. Elle est aussi vraie pour les blés d'hiver, avec un effet variable en fonction de la race/isolat utilisé (Kariyawasam *et al.*, 2016 et 2018).

D'autres travaux ont identifié des génotypes sensibles à la Ptr ToxA mais résistants aux races 1 et 2 (Noriel *et al.*, 2011 ; Liu *et al.*, 2015 ; Kariyawasam *et al.*, 2016). Cette absence d'association de l'interaction Ptr ToxA-*Tsn1* avec la maladie démontre la complexité dans le pathosystème blé/*P. tritici-repentis*, et peut être due à la présence d'une résistance non spécifique à la race. Ces faits rappellent que les programmes de sélection visant à développer des blés résistants à la tache auréolée, ne devraient probablement pas s'appuyer uniquement sur les réactions aux toxines, comme pratiqué dans plusieurs laboratoires. L'évaluation des réactions aux différentes races existantes, telle conduite dans le présent travail, nous semble une approche plus judicieuse. Dans le cas contraire des blés insensibles aux toxines mais qui sont toujours sensibles à la tache auréolée, pourraient être sélectionnés.

Par ailleurs, il a été montré que la résistance à la nécrose induite par la race 1 est contrôlée par un même gène récessif unique à la fois chez le blé dur et le blé tendre (Lamari et Bernier, 1991 ; Gamba et Lamari, 1998 ; Gamba *et al.*, 1998 ; Singh et Hughes, 2005 ; Singh *et al.*, 2008b). Ce gène, nommé *Tsr1*, est récessif (McIntosh *et al.*, 2008), il est situé sur le chromosome 5BL (Anderson *et al.*, 1999; Faris *et al.*, 1996; Stock *et al.*, 1996). D'autres travaux ont montré

l'existence d'autres gènes de résistance à la race 1 ; le gène récessif *Tsr3* situé sur le chromosome 3DS (Tadesse *et al.*, 2006a, 2007) ; le gène *Tsr4* chez le cultivar 'Salamouni' situé sur le chromosome 3A (Tadesse *et al.*, 2006b).

Parmi le germplasm évalué dans cette étude, plusieurs génotypes se sont montrés modérément résistants à modérément sensibles (type de lésion 3), ce qui indique que plus d'un gène peuvent être impliqués dans le conditionnement de la résistance (Effertz *et al.*, 2001). Dans ce contexte, la résistance du blé a également été jugée quantitative par plusieurs recherches (Nagle *et al.*, 1982 ; Elias *et al.*, 1989 ; Faris *et al.*, 1997 ; Effertz *et al.*, 2002 ; Friesen et Faris, 2004). La résistance quantitative a été qualifiée comme complexe, ne suivant pas une transmission mendélienne (Nagle *et al.*, 1982), avec un héritage polygénique (Elias *et al.*, 1989). Ceux-ci, démontrent encore la complexité de la résistance et son interaction avec les conditions environnementales (Shankar *et al.*, 2017).

Ce type de résistance a été aussi rapporté par Friesen et Faris (2004), qui ont identifié trois QTL pour la résistance à la race 5 sur les chromosomes 2AS, 4AL et 2BL. Corsi *et al.* (2020) ont identifié un QTL à effet mineur sur le bras long du chromosome 2A, différent des QTL précédemment identifiés, contrôlant la sensibilité aux isolats de la race 5. Ils sont situés sur les chromosomes 2BS (Singh *et al.*, 2010), 2AS et 2BL (Friesen et Faris, 2004).

A la lumière des données précédentes réunies à travers les nombreux résultats recueillis dans le monde, et étant donné que le pedigree des sources de résistance identifiées dans cette étude indique qu'elles proviennent de diverses origines génétiques (Annexe 2) ; elles pourraient éventuellement posséder différents gènes de résistance. Ces génotypes peuvent être utilisés dans le développement de cultivars présentant une résistance large et durable à la tache auréolée.

Il est important de relever dans le contexte des résultats obtenus, que les cultivars de blé sensibles à la fois aux races 1 et 5, peuvent être une source potentielle de survie de celles-ci dans une région donnée. Ceci met en évidence un danger potentiel supplémentaire de l'utilisation d'un tel matériel végétal. Il pourrait rendre la gestion de la maladie plus difficile. En effet la prolifération des deux races dans un même champ de blé, voir dans une même région, peut jouer un rôle important dans le développement de nouvelles races plus virulentes, telles que la race 6 (une combinaison de Ptr ToxB et Ptr ToxC), la race 7 (Ptr ToxA et Ptr ToxB), et la race 8 (Ptr ToxA, Ptr ToxB et Ptr ToxC). Celles-ci résultent d'une combinaison de la race 1 (Ptr ToxA et Ptr ToxC) et de la race 5 (Ptr ToxB). Ceci est fort possible, car le champignon *P. tritici-repentis* est présent toute l'année sur les résidus de blé, et produit plusieurs cycles asexués durant tout le cycle végétatif de la plante. La présence de deux races différentes (1 et 5) sur la même feuille



et/ou dans différentes plantes au sein du même champ, offre aussi de nombreuses opportunités au champignon pour la reproduction sexuée, et conduit à l'évolution d'une nouvelle race.

La sensibilité retrouvée chez plus de 2/3 des génotypes à l'égard de l'une des deux races (82 % pour la race 1 et 71 % pour la race 5), et plus que la moitié à la fois aux deux races (62 %), trouve une origine très probablement dans l'utilisation des génotypes sensibles aux deux races 1 et 5 dans les programmes de sélection de blé. Des observations similaires ont été rapportées par Lamari *et al.* (2005) au Canada, lorsque les causes d'une sensibilité accrue des cultivars de blé canadiens à la race 5 dans les années 1960, avait été étudiée. Ces travaux avaient permis de remonter jusqu'à un génotype sensible qui avait été fortement utilisé pour développer des génotypes à haut rendement résistants aux rouilles au Canada et aux États-Unis, dans les années 1960.

La présence d'une sensibilité plus ou moins accrue à la race 5 déjà signalée dans le monde à travers plusieurs études, semble surprenante. En effet, la race 5 n'a pas été observée avant 1995, date à laquelle elle a été signalée pour la première fois en Algérie (Lamari *et al.*, 1995), puis dans d'autres pays d'Asie et d'Amérique du Nord, et bien plus tard dans les autres pays d'Afriques du nord (Ali *et al.*, 1999 ; Strelkov *et al.*, 2002 ; Lamari *et al.*, 2003 ; Lamari *et al.*, 2005b ; Benslimane *et al.*, 2011 ; Abdullah *et al.*, 2016 ; Gamba *et al.*, 2017 ; Kamel *et al.*, 2019). Ainsi, la sensibilité répandue à la race 5 dans les génotypes de blé suggère que la race 5 est présente depuis bien plus longtemps et peut-être même avant la race 1 dans la plupart des régions céréalières.

Le germplasm évalué révèle aussi une sensibilité plus importante à l'égard de la race 1 ; le nombre de génotypes sensibles à la race 1 (82 %) étaient en effet plus important que celui des génotypes sensibles à la race 5 (71 %). L'évaluation des génotypes de blé tendre et de blé dur à l'égard de cette maladie en utilisant les deux races 1 et 5 dans deux études indépendantes menées par Ali *et al.* (2008) et Singh *et al.* (2006a), a également révélé une sensibilité plus élevée à la race 1.

L'identification des sources de résistance à la maladie de la tache auréolée dans le matériel végétal évalué a été précédée par plusieurs autres rapports à travers le monde. Rees et Platz (1990) et Riede *et al.* (1996) ont évalué une collection de variétés de blé brésiliennes et chinoises. De même, Gilchrist (1992) a identifié une résistance dans des lignées brésiliennes, chinoises et mexicaines. Plus tard, Singh *et al.* (2006a) ont évalué des cultivars et des lignées de blé dur et de blé de printemps ; ont trouvé dix génotypes présentant un niveau élevé de résistance à plusieurs races de *P. tritici-repentis*, ainsi qu'aux toxines qu'il produit. Une bonne résistance à

la tache auréolée a également été constatée chez quelques cultivars couramment cultivés au Danemark (Jorgensen et Olsen, 2007). De même que chez des blés tendres et des blés durs provenant d'Afrique, d'Asie, d'Australie, d'Europe, d'Amérique du Nord et d'Amérique du Sud (Noriel *et al.*, 2011 ; Abdullah *et al.*, 2017 ; Kokhmetova *et al.*, 2017) et chez les accessions Vavilov du Pakistan, de Russie, et de l'Inde (Dinglasan *et al.*, 2018).

Par ailleurs, un niveau élevé de résistance à la tache auréolée associée à d'autres maladies foliaires du blé a également été mis en évidence par plusieurs auteurs évaluant des génotypes provenant de différentes origines (Sharma *et al.*, 2004 ; Singh *et al.*, 2006b ; Ali *et al.*, 2007 ; Oliver *et al.*, 2008 ; Gurung *et al.*, 2009, 2014). L'association de la résistance aux qualités agronomiques recherchées est aussi possible ; Mergoum *et al.* (2006) ont pu identifier une lignée de blé "ND 735" qui combine la résistance aux taches auréolées et les rouilles, un niveau modéré de résistance au *Fusarium*. Ceci était associé à de bonnes caractéristiques recherchées pour la production du pain, et un rendement relativement élevé.

En outre, Ahmadi *et al.* (2018) a prouvé que des espèces sauvages sont une source exceptionnelle de résistance aux stress abiotiques et biotiques. Dans le cas de la maladie de la tache auréolée, Chu *et al.* (2008) ont montré que le blé sauvage (*Triticum dicoccoides*), est une bonne source génétique de résistance à la fois à la septoriose et à la tache auréolée. De même, Riede *et al.* (1996) ont signalé des sources de résistance à la tache auréolée chez les lignées dérivées de l'espèce *Agropyron distichum*.

La complexité des populations de *P. tritici-repentis* en Algérie montre l'importance de rechercher des sources de résistance à la maladie de la tache auréolée en fonction des races présentes. L'utilisation de cultivars résistants est en effet le moyen le plus efficace et le plus économique pour lutter contre les pertes de rendements causées par cette maladie (Zhang *et al.*, 1997 ; Friesen et Faris, 2004 ; See *et al.*, 2018).

---

# **V- Conclusion Et Perspectives**

---

Le présent travail a permis de faire la lumière sur l'une des maladies fongiques du blé les plus fréquemment rencontrée dans les différentes zones céréalières du pays. Et ceci en apportant de précieuses données relatives à la structure de la population de l'agent causal *P. tritici-repentis*, à l'un de ses facteurs de virulence, et aux sources de résistance à son égard disponibles actuellement dans le pays.

Les résultats obtenus, ont montré la présence de la maladie dans 24 localités prospectées au niveau de 15 wilayas du pays. 26 échantillons de blé infectés par la maladie nous ont permis de réunir une collection composée de 75 isolats, à laquelle ont été ajoutés 10 isolats provenant d'échantillons collectés dans les champs tunisiens. Cette nouvelle collection a été ajoutée aux anciennes collections composées de 128 isolats, venant de 3 différents pays ; l'Algérie, la Tunisie et la Syrie, pour réunir un total de 213 isolats, utilisés lors de nos travaux.

Les isolats obtenus ont été isolés aussi bien sur les cultures de blé dur que celles de blé tendre ; parmi les variétés attaquées par le champignon dans les champs visités nous citons Chen's, Hiddab, Anza (Blé tendre) et Vitron, waha, Bidi 17, Semeto (blé dur). Dans ce contexte, il est important de noter que les variétés communément cultivées, à savoir, Hiddab et Vitron paraissent particulièrement sensibles à ce champignon.

La caractérisation morphologique de 97 isolats (isolats de 2015 et 2016), a montré l'existence d'une variabilité importante entre les isolats.

L'observation des caractéristiques culturelles, a révélé la présence de deux couleurs différentes de colonies ; blanches ou vertes, et de grouper les isolats étudiés en trois morphotypes en se basant sur la texture du mycélium. La production d'un pigment vert dans le milieu a été remarquée pour la plupart des isolats. L'apparition d'une couleur orange a été parfois observée pour certaines colonies accompagnée par une perte de sporulation, liée à un repiquage répété. Ces observations ont permis également de constater que le classement distingué des isolats, ainsi que les autres caractères culturels examinés (agrégations mycéliennes...etc.), n'était pas associée à leurs origines géographiques.

L'évaluation de la croissance mycélienne journalière des colonies, ainsi que du pouvoir de sporulation a révélé une différence très hautement significative entre les isolats étudiés. En considérant la moyenne de la croissance journalière de l'ensemble des isolats incubés à 25°C, un maximum de 6,75 mm/jours et un minimum de 3,67 mm/jours ont été enregistrés. Par ailleurs, les résultats du pouvoir de sporulation ont permis de constater l'efficacité du jus V8 indispensable à la sporulation préparé au laboratoire ; les résultats de cette étude ont enregistré un maximum de 31297 spores/ml/cm<sup>2</sup>, et un minimum de 1258 spores/ml/cm<sup>2</sup>.

Dans ce travail on a également pu isoler le champignon *P. tritici-repentis* à partir des feuilles d'orge ceci indique son existence sur orge. Cette présence indique un réservoir potentiel de la diversification de cette population pathogène en Algérie, pouvant être à l'origine de l'apparition possible de nouveaux biotypes génétiquement différents de ceux qui existent déjà sur le blé. Un élément à considérer dans l'épidémiologie de la maladie dans la région.

L'analyse de la diversité génétique chez *P. tritici-repentis* a été effectuée en utilisant deux marqueurs moléculaires ; les marqueurs SCoT appliqués à 73 isolats et les marqueurs SSR appliqués à 76 isolats. Sur les différents marqueurs testés appartenant aux deux types, 10 ont été sélectionnés du fait qu'ils ont permis l'amplification de l'ADN et un produit un polymorphisme. Ces dernières ont mis une évidence une grande variabilité génétique au sein de la population étudiée ; celle-ci a été exprimée par la présence de 70 haplotypes pour les marqueurs SCoT et 40 haplotypes pour les SSR. L'importance de cette diversité a aussi été révélée par les valeurs de l'indice de similarité de Jaccard qui ont été dans la plupart des cas, faibles.

La recherche de possibles variations dans le gène ToxA, a montré la présence de ce gène chez 150 Isolats ; 121 isolats provenant d'Algérie, 11 isolats provenant de Tunisie, et 18 isolats provenant de Syrie. Ainsi, ce gène était plus fréquent chez les isolats du Nord de l'Afrique que chez ceux du Moyen Orient.

Les données révélées par PCR et relatives à la présence ou l'absence du gène de virulence ToxA, nous ont permis de supposer le type des races auxquelles appartiennent les isolats à partir desquels les ADN ont été extraits. Ils pourraient être de la race 2, de la race 1, de la race 7, ou encore de la race 8, chez qui la toxine Ptr ToxA est présente seule ou avec d'autres toxines (Ptr ToxB et/ou Ptr ToxC).

Le séquençage du gène ToxA chez 25 isolats a montré la présence de variations chez 2 isolats de ce champignon. Un haplotype nouveau jamais décrit a été identifié. La variation était à la position 862 pb de ce locus chez les isolats I7.8 et I7.9, il s'agit d'une substitution unique et silencieuse, qui substitue le codon CGG par le codon CGA ; les deux codent pour le même acide aminé, l'Arginine.

L'identification des races des isolats ayant montré une variation du gène ToxA, a montré qu'ils appartiennent à la race 2 ; ceci est la première signalisation de la race 2 en Algérie. L'infiltration du filtrat de culture des deux isolats à la variété sensible de référence « Glenlea », a confirmé la sensibilité de cette dernière au filtrat de culture. Ceci a confirmé la présence de la toxine Ptr ToxA active ; la variation rapportée au niveau de ToxA étant une mutation silencieuse.

Enfin , l'analyse de la réaction de 116 génotypes de blés durs et tendres à l'égard de deux races de référence 1 et 5, a permis de sectionner 30 génotypes de blé (dur et tendre), qui ont réagi par une résistance ou une résistance modérée. Parmi ceux-ci, 13 génotypes ont montré une résistance ou une résistance modérée à l'égard de la race 1, alors que 23 génotypes ont montré cette réaction à l'égard de la race 5. Ainsi, l'analyse des réactions a montré que seulement 7 génotypes sont résistants à la fois aux deux races 1 et 5. L'analyse a montré également que les génotypes évalués résistants, étaient plus représentés par les cultivars ; que par les variétés locales, ou lignés.

Les résultats obtenus ont été confirmé une deuxième fois en conditions contrôlés, puis en plein champs ; tous les génotypes ont montré exactement les mêmes réactions de résistance que ce soit pour la race 1 ou la race 5.

A la lumière des résultats obtenus lors de nos travaux, il serait intéressant dans le future de poursuivre l'exploration de ce pathosystème en Algérie, en abordant les aspects suivants ;

La sporulation des isolats de *P. tritici-repentis* devrait également être étudiée sur des feuilles de blé *in vivo* ; cela permettra d'initier des études épidémiologique et pourra aider à prévoir les épidémies.

La sélection de génotypes avec les différents effecteurs au *P. tritici-repentis*, est une prévision importante à prendre en compte dans le développement de nouveaux cultivars résistants à l'avenir.

Par ailleurs, les meilleures stratégies pour accroître la résistance à la grande diversité des isolats de *P. tritici-repentis*, impliqueront probablement des approches combinées. A travers celles-ci, la suppression des *loci* de sensibilité aux effecteurs, devrait être complétée par la cartographie de QTL conférant la résistance à la tache auréolée. L'utilisation de la sélection assistée par marqueurs moléculaires (MAS=Marker assisted selection) sera très utile.

Les résultats de cette étude confirme qu'une population diversifiée de *P. tritici-repentis* existe sur le blé en Algérie, et ce à travers la découverte également de la race 2 pour la première, qui s'ajoute à la complexité de cette population pathogène déjà connue. Nous pensons que les informations disponibles sur les populations de *P. tritici-repentis* dans diverses régions géographiques céréalières d'Algérie sont toujours insuffisantes. Une analyse plus approfondie et actualisée de la structure de la population du pathogène et de la variation de ses effecteurs, nous semble nécessaire. Ceci va aider notamment à un meilleur déploiement des génotypes résistants.

Il est proposé que les nouveaux génotypes sélectionnés, et la méthodologie de sélection adoptée dans le cadre de ce projet, soient introduits dans les programmes de sélection. L'objectif étant le développement rapide de variétés présentant des niveaux élevés de résistance, aux stades de plantules et de plantes adultes.

Compte tenu de sa différenciation symptomatologique difficile entre l'agent causal du tan spot et du *Parastagonospora nodorum*, qui est un autre pathogène important du blé, et plus particulièrement lors des premiers stades de l'infection, un test de diagnostic moléculaire, rapide et précis à différents stades de la vie des plantes, est très demandé.

La variabilité des isolats de *P. tritici-repentis* peut être mieux étudiée en combinant d'autres paramètres, tels, la période de latence, la sensibilité et la résistance aux fongicides...etc. Ceci va aider à la compréhension des épidémies et la gestion de cette importante maladie.

Enfin, le pathogène doit être surveillé périodiquement pour tout changement de virulence et donc, une surveillance de l'évolution de la distribution des races est toujours une action importante dans la gestion de la tache auréolée.

---

# **VI- Références Bibliographiques**

---



- Abdullah, S. 2017. Characterization of *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat and rye to study tan spot susceptibility and insights into its relationship with stem rust resistance. Thèse de Doctor of Philosophy, South Dakota State University, South Dakota, 202p.
- Abdullah, S., Byamukama, E., Langham, M. and Ali, S. 2016. First report of *Pyrenophora tritici-repentis* race 5 from South Dakota. *Plant Disease*. 100: 2322.
- Abdullah, S., Sehgal, S. K., Ali, S., Liatukas, Z., Ittu, M. and Kaur, N. 2017a. Characterization of *Pyrenophora tritici-repentis* (Tan Spot of Wheat) Races in Baltic States and Romania. *The plant pathology journal*. 33(2): 133-139.
- Abdullah, S., Sehgal, S. K., and Ali, A. 2017b. Race diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* in South Dakota and response of predominant wheat cultivars to tan spot. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*. 8(5): 409.
- Abeyssekara, N. S., Friesen, T. L., Liu, Z. H., McClean, P. E. and Faris, J. D. 2010. Marker development and saturation mapping of the tan spot Ptr ToxB sensitivity locus *Tsc2* in hexaploid wheat. *Plant Genome*. 3(3): 179-189.
- Aboukhaddour, R. and Strelkov, S. E. 2016. Exploring de novo specificity: The *Pyrenophora tritici-repentis*–barley interaction. *Plant Pathology*. 65(8): 1347-1357.
- Aboukhaddour, R., Cloutier, S. and Strelkov, S. E. 2011. Simple sequence repeats and diversity of globally distributed populations of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 33(3): 339-399.
- Aboukhaddour, R., Cloutier, S., Ballance, G. M. and Lamari, L. 2009. Genome characterization of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates reveals high plasticity and independent chromosomal location of ToxA and ToxB. *Molecular Plant Pathology*. 10(2): 201-212.
- Aboukhaddour, R., Kim, Y. M. and Strelkov, S. E. 2012. RNA-mediated gene silencing of ToxB in *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant Pathology*. 13: 318-326.
- Aboukhaddour, R., Turkington, T. K. and Strelkov, S. E. 2013. Race structure of *Pyrenophora tritici-repentis* (tan spot of wheat) in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 35(2): 256-268.
- Abrinbana, M., Mozafari, J., Shamsbakhsh, M. and Mehrabi, R. 2010. Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations in Iran. *Plant Pathology*. 59(5): 829-838.

- Adhikari, T. B., Ali, S., Burlakoti, R. R., Singh, P. K., Mergoum, M. and Goodwin, S. B. 2008. Genetic structure of *Phaeosphaeria nodorum* populations in the north-central and midwestern United States. *Phytopathology*. 98: 101–107.
- Ahmad, N. N., Cu-Unjieng, A. B. and Donoso, L. A. 1995. Modification of standard proteinase K/phenol method for DNA isolation to improve yield and purity from frozen blood. *Journal of Medical Genetics*. 32(2): 129-130.
- Ahmadi, J., Pour-Aboughadareh, A., Ourang, S. F., Mehrabi, A. A. and Siddique, K. H. M. 2018. Wild relatives of wheat: *Aegilops triticum* accessions disclose differential antioxidative and physiological responses to water stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 40: 90.
- Ainsworth G. C., Sparrow F. K. and Sussman A. S. 1973. The fungi IVA. A taxonomic review with keys. Academic press, New York, 621p.
- Alfano J. R. and Collmer A. 1996. Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall. *The Plant Cell*. 88: 1683–1698.
- Ali, S. and Francl, L. J. 2001. Recovery of *Pyrenophora tritici-repentis* from barley and reaction of 12 cultivars to five races and two host-specific toxins. *Plant Disease*. 85(6): 580-584.
- Ali, S. and Francl, L. J. 2002. Race structure of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates obtained from wheat in South America. *Plant Protection Science*. 38(2): 302-304.
- Ali, S. and Francl, L. J. 2003. Population race structure of *Pyrenophora tritici-repentis* prevalent on wheat and non-cereal grasses. *Plant Disease*. 87(4): 418-422.
- Ali, S. and Langham, M. A. 2015. Reaction of Five Non-cereal Grasses to Five Races and Two Host Selective Toxins of *Pyrenophora tritici-repentis*. *The plant pathology journal*. 31(3): 245-251.
- Ali, S., Adhikari, T., Barbara, S. and Cole, H. 2006. *Pyrenophora tritici-repentis* (Tan spot) races in Australia. In: 2006 APS Annual Meeting, Abstracts of Presentations. Quebec City, July 29- August 2. *Phytopathology*. 96(6): S4.
- Ali, S., Cartwright, R., Friesen, T., Rasmussen, J. and Milus, G. 2003. Novel *Pyrenophora tritici-repentis* isolate from Arkansas wheat. (Abstr.) *Phytopathology*. 93: S3.
- Ali, S., Francl, L. J. and De Wolf, E. D. 1999. First report of *Pyrenophora tritici-repentis* race 5 from North America. *Plant Disease*. 83(6): 591.
- Ali, S., Gurung, S. and Adhikari, T. B. 2010. Identification and characterization of novel isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from Arkansas. *Plant Disease*. 94(2): 229-235.

- Ali, S., Ling, H., Meinhardt, S. and Francl, L. 2002. A new race of *Pyrenophora tritici-repentis* that produces a putative host-selective toxin. *Phytopathology*. 92(3).
- Ali, S., Singh, P. K., McMullen, M. P., Mergoum, M. and Adhikari, B. T. 2008. Resistance to multiple leaf spot diseases in wheat. *Euphytica*. 159: 167-179.
- Amaike, S., Ozga, J. A., Basu U. and Strelkov, S. E. 2008. Quantification of ToxB gene expression and formation of appressoria by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* differing in pathogenicity. *Plant Pathology*. 57(4): 623-633.
- Anderson, J. A., Effertz, R. J., Faris, J. D., Francl, L. J., Meinhardt, S. W. and Gil, B. S. 1999. Genetic analysis of sensitivity to a *Pyrenophora tritici-repentis* necrosis inducing toxin in durum and common wheat. *Phytopathology*. 89: 293-297
- Andrie, R. M., Pandelova, I. and Ciuffetti, L. M. 2007. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification. *Phytopathology* 97(6): 694-701.
- Antoni, E. A., Rybak, K., Tucker, M. P., Hana, J. K., Solomon, P. S., Drenth, A., Shankar, M. and Oliver, R. P. 2010. Ubiquity of *ToxA* and absence of *ToxB* in Australian populations of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Australian Plant Pathology*. 39: 63–68.
- Aquino de Muro, M., Elliott, S., Moore, D., Parker, B. L., Skinner, M., Reid, W. and El Bouhssini, M. 2005. Molecular characterization of *Beauveria bassiana* isolates obtained from over wintering sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). *Mycological Research*. 109: 294-306.
- Arenal, T., Platas, G., Martin, J., Asenso, F. J., Salazar, O., Collado, J., Vicente, F., Basilico, A., Ruibal, C., Royo, I., de Pedro, N. and Peláez, F. 2002. Comparison of genotypic and phenotypic techniques for assessing the variability of the fungus *Epicoccum nigrum*. *Journal of Applied Microbiology*. 93: 36-45.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. and Patel, H. R. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*. 5(2): 209-219.
- Aung, T. S. T. 2001. Molecular polymorphism and virulence of *Pyrenophora tritici-repentis*. Master of Science thesis, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, 82p.
- Ballance, G. M., Lamari, L. and Bernier, C. C. 1989. Purification and characterization of a host selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 35: 203-213.

- Ballance, G. M., Lamari, L., Kowatsch, R. and Bernier, C. C. 1996. Cloning expression and occurrence of the gene encoding the Ptr necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant Pathology*. On-Line 1996/1209 ballance.
- Bankina, B., Bimsteine, G., Arhipova, I., Kaņeps, J. and Stanka, T. 2018. Importance of agronomic practice on the control of wheat leaf diseases. *Agriculture*. 8(4): 56.
- Bao, J., Chen, M., Zhong, Z., Tang, W., Lin, L., Zhang, X., Jiang, H., Zhang, D., Miao, C., Tang, H., Zhang, J., Lu, G., Ming, R., Norvienenyaku, J., Wang, B. and Wang, Z. 2017. PacBio sequencing reveals transposable elements as a key contributor to genomic plasticity and virulence variation in *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant*. 10: 1465–1468.
- Baroncelli, R., Amby, D. B., Zapparata, A., Sarrocco, S., Vannacci, G., Le Floch, G., Harrison, R. J., Holub, E., Sukno, S. A., Sreenivasaprasad, S. and Thon, M. R. 2016. Gene family expansions and contractions are associated with host range in plant pathogens of the genus *Colletotrichum*. *BMC genomics*. 17(1): 1-17.
- Benslimane, H. 2002. Caractérisation de quelques isolats de *Pyrenophora graminea* S. Ito & Kuribay et leur comportement à l'égard de cinq génotypes d'orge. Mémoire de Magister, Institut National Agronomique, El-Harrach, Alger, 82p.
- Benslimane, H. 2012. Etude de la tache bronzée du blé en Algérie : Identification des races de l'agent causal *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs et diversité génétique. Thèse de Dotorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El-Harrach, Alger, 156p.
- Benslimane, H. 2014. Simple method to produce *in vitro* *Pyrenophora tritici-repentis* teleomorph. *The Plant Pathology Journal*. 30(4): 437-439.
- Benslimane, H. 2014b. Pathogens population characterization in Algeria, A case of study: *Pyrenophora tritici-repentis*/wheat pathosystem analysis in Algeria. Central research institute for field crops, Ankara, Turkey. 2014.
- Benslimane, H. 2017. *In Vitro* Morphological Characteristics of *Pyrenophora tritici-repentis* Isolates from Several Algerian Agro-Ecological Zones. *Plant Pathology Journal*. 33(2): 109-117.
- Benslimane, H. 2018. Virulence phenotyping and molecular characterization of a new virulence type of *Pyrenophora tritici-repentis* the causal agent of tan spot. *The plant pathology journal*. 34(2): 139-142.

- Benslimane, H., Lababidi, S., Yahyaoui, A., Ogbonnaya, F., Bouznad, Z. and Baum, M. 2013. Genetic diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* in Algeria as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *African Journal of Biotechnology*. 12(26): 4082-4093.
- Benslimane, H., Lamari, L., Benbelkacem, A., Sayoud, R. and Bouznad, Z. 2011. Distribution of races of *Pyrenophora tritici-repentis* in Algeria and identification of a new virulence type. *Phytopathologia Mediterranea*. 50(2): 203-211.
- Bessaoud, O., Pellissier, J.-P., Rolland, J.-P. and Khechimi, W. 2019. Rapport de synthèse sur l'agriculture en Algérie. Rapport de recherche, CIHEAM-IAMM. pp.82.
- Bhadauria, V., MacLachlan, R., Pozniak, C. and Banniza, S. 2015. Candidate effectors contribute to race differentiation and virulence of the lentil anthracnose pathogen *Colletotrichum lentis*. *BMC genomics*. 16(1): 628.
- Bhatta, M., Regassa, T., Wegulo, S. N. and Baenziger, P. S. 2018. Foliar Fungicide Effects on Disease Severity, Yield, and Agronomic Characteristics of Modern Winter Wheat Genotypes. *Agronomy Journal*. 110(2): 602-610.
- Bockus, W. W. 1998. Control strategies for stubble-borne pathogens of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20(4): 371-375.
- Bogacki, P., Keiper, F. J. and Oldach, K. H., 2010. Genetic structure of South Australian *Pyrenophora teres* populations as revealed by microsatellite analyses, *Fungal Biology*. 114: 834–841.
- Boungab, k. 2013. La rayure réticulée de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) dans le Nord-Ouest Algérien : importance, morphologie et pouvoir pathogène chez *Pyrenophora teres* f. *teres* et recherche de moyens de lutte. Thèse de Doctorat. Université d'Oran, Oran, Algérie. 171p.
- Broad Institute. 2007. *Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP WGS sequencing, assembly, and annotation. (*Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP (ID 18815) - BioProject – NCBI nih.gov)
- Bundock, P., Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A. and Hooykaas, P. J. 1995. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the European Molecular Biology Organization*. 14: 3206-3214.
- Burdon, J. J. and Roelfs, A. P. 1985. The effect of sexual and asexual reproduction on the isozyme structure of population of *Puccinia graminis*. *Phytopathology*. 75: 1068-1073.

- Bustin, S. A. 2002. Invited review Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*. 29: 23-39.
- Campbell, G. F., Crous, P. W. and Lucas J.A. 1999. *Pyrenophora teres* f. *maculata*, the cause of *Pyrenophora* leaf spot of barley in South Africa. *Mycological Research*. 103: 257-267.
- Cantarella, C., and D'Agostino, N. 2015. PSR: polymorphic SSR retrieval. *BMC research notes*. 8(1): 1-6.
- Cardoso, J. E. and Wilkinson, M. J., 2008. Development and characterisation of microsatellite markers for the genus *Lasiodiplodia theobromae*. *Summa Phytopathologica*. 34: 55-57.
- Chen, R. S. and McDonald, B. A. 1996. Sexual reproduction plays a major role in the genetic structure of populations of the fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Genetics*. 142(4): 1119-1127.
- Chittem, K., Yajima, W. R., Goswami, R. S. and del Río Mendoza, L. E. 2020. Transcriptome analysis of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* interaction with resistant and susceptible canola (*Brassica napus*) lines. *PLoS ONE*. 15: e0229844.
- Christensen, J. J. and Graham, T. W. 1934. Physiologic specialisation and variation in *Helminthosporium gramineum* Rab. *Technical bulletin*. 95: 3-40.
- Chu, C. G., Chao, S., Friesen, T. L., Faris, J. D., Zhong, S. and Xu, S. S. 2010. Identification of novel tan spot resistance QTLs using an SSR based linkage map of tetraploid wheat. *Molecular Breeding*. 25(2): 327-338.
- Chu, C. G., Friesen, T. L., Faris, J. D. and Xu, S. S. 2008a. Evaluation of seedling resistance to tan spot and *Stagonospora nodorum* blotch in tetraploid wheat. *Crop Science*. 48(3): 1107-1116.
- Chu, C. G., Friesen, T. L., Xu, S. S. and Faris, J. D. 2008b. Identification of novel tan spot resistance loci beyond the known host-selective toxin insensitivity genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 117(6): 873-881.
- Chuma, I., Isobe, C., Hotta, Y., Ibaragi, K., Futamata, N., Kusaba, M., Yoshida, K., Terauchi, R., Fujita, Y., Nakayashiki, H., Valent, B. and Tosa, Y. 2011. Multiple translocation of the AVR-Pita effector gene among chromosomes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and related species. *PloS Pathogens*. 7: e1002147.
- Ciuffetti, L. M. and Tuori, R. P. 1999. Advances in the characterization of the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction. *Phytopathology*. 89(6): 444-449.

- Ciuffetti, L. M., Francl, L. J., Ballance, G. M., Bockus, W. W., Lamari, L., Meinhardt, S. W. and Rasmussen, J. B. 1999. Standardization of toxin nomenclature in the *Pyrenophora tritici-repentis*/wheat interaction. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 422-425.
- Ciuffetti, L. M., Francl, L. J., Ballance, G. M., Bockus, W. W., Lamari, L., Meinhardt, S. W. and Rasmussen, J. B. 1998. Standardization of toxin nomenclature in the *Pyrenophora tritici-repentis*/wheat interaction. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 421-424.
- Ciuffetti, L. M., Manning, V. A., Pandelova, I., Betts, M. F. and Martinez, J. P. 2010. Host-selective toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the *Pyrenophora tritici-repentis*–wheat interaction. *New Phytologist*. 187: 911-919.
- Ciuffetti, L. M., Manning, V. A., Pandelova, I., Faris, J. D., Friesen, T. L., Strelkov, S. E., Weber, G. L., Goodwin, S. B., Wolpert, T. J. and Figueroa, M. 2014. *Pyrenophora tritici-repentis*: a plant pathogenic fungus with global impact. In *Genomics of plant-associated fungi: monocot pathogens* (pp. 1-39). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ciuffetti, L. M., Tuori, R. P. and Gaventa, J. M. 1997. A single gene encodes a selective toxin causal to the development of Tan Spot of wheat. *The Plant Cell*. 9: 135-144.
- Collard, B. C. and Mackill, D. J. 2009. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*. 27(1): 86-93.
- Connors, L. L. 1937. 17th Annual Reports of the Canadian Plant Disease Survey. p. 5.
- Corsi, B., Percival-Alwyn, L., Downie, R. C., Venturini, L., Iagallo, E. M., Mantello, C. C., McCormick-Barnes, C., See, P. T., Oliver, R. P., Moffat, C. S. and Cockram, J. 2020. Genetic analysis of wheat sensitivity to the ToxB fungal effector from *Pyrenophora tritici-repentis*, the causal agent of tan spot. *Theoretical and Applied Genetics*. 133(3): 935-950.
- Cotuna, O., Paraschivu, M., Paraschivu, A. M. and Sarateanu, V. 2015. The influence of tillage, crop rotation and residue management on tan spot (*Drechslera tritici-repentis*. Died. Shoemaker) in winter wheat. *Research Journal of Agricultural Science*. 47(2): 13-21.
- Cox, C. M., Garrett, K. A., Bowden, R. L., Fritz, A. K., Dendy, S. P. and Heer, W. F. 2004. Cultivar mixtures for the simultaneous management of multiple diseases: tan spot and leaf rust of wheat. *Phytopathology*. 94(9): 961-969.
- Cox, D. J. and Hosford, R. M. Jr. 1987. Resistant winter wheats compared at differing growth stages and leaf positions for tan spot severity. *Plant Disease*. 71: 883-886.

- Croll, D. and McDonald, B. A. 2012. The accessory genome as a cradle for adaptive evolution in pathogens. *PLoS Pathogens*. 8: e1002608.
- Crossa, J., Burgeno, J., Dreisigacker, S., Vargas, M., Herrera-Foessel, S. A., Lillemo, M. and Singh, R. P. 2007. Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive covariance of relative and population structure. *Genetics*. 177: 1889-1913.
- Davière, J-M., Langin, T. and Daboussi, M-J. 2001. Potential role of transposable elements in the rapid reorganization of the *Fusarium oxysporum* genome. *Fungal Genetics and Biology*. 34(3): 177-192.
- Day, J., Gietz, R. D. and Rampitsch, C. 2015. Proteome changes induced by *Pyrenophora tritici-repentis* ToxA in both insensitive and sensitive wheat indicate senescence-like signaling. *Proteome science*. 13: 3.
- de Vicente, M. C. and Fulton, T. 2015. Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity. Illus. Nelly Giraldo. IPGRI, Rome, Italy and Institute for Genetic Diversity, Ithaca, New York, USA. 375p.
- De Wit, P. J., Van Der Burgt, A., Ökmen, B., Stergiopoulos, I., Abd-Elsalam, K. A., Aerts, A. L., Bahkali, A. H., Beenen, H. G., Chettri, P., Cox, M. P., Datema, E., de Vries, R. P., Dhillon, B., Ganley, A. R., Griffiths, S. A., Guo, Y., Hamelin, R. C., Henrissat, B., Kabir, M. S., Jashni, M. K., Kema, G., Klaubauf, S., Lapidus, A., Levasseur, A., Lindquist, E., Mehrabi, R., Ohm, R. A., Owen, T. J., Salamov, A., Schwelm, A., Schijln, E., Sun, H., van den Burg, H. A., van Ham, R. C. H. J., Zhang, S., Goodwin, S. B., Grigoriev, I. V., Collemare, J. and Bradshaw, R. E. 2012. The genomes of the fungal plant pathogens *Cladosporium fulvum* and *Dothistroma septosporum* reveal adaptation to different hosts and lifestyles but also signatures of common ancestry. *PLoS Genetics*. 8(11): e1003088.
- De Wolf, E. D. 2008. Black point in Wheat: Is a seed treatment needed? *K-Stat Agronomy extension e-Updates*. n. 155. Ed. K-Stat Extension Agronomy and Steve Watson, 5p.
- De Wolf, E. D., Effertz, R. J., Ali, S. and Francl, L. J. 1998. Vistas of tan spot research. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 349-370.
- Deacon, J. W. 2006. *Fungal Biology*. 4<sup>th</sup> Ed. Blackwell Publishing Ltd. London, UK. 371p.
- Derbyshire, M., Denton-Giles, M., Hegedus, D., Seifbarghy, S., Rollins, J., van Kan, J., Seidl, M. F., Faino, L., Mbengue, M., Navaud, O., Raffaele, S., Hammond-Kosack, K., Heard, S. and Oliver R. P., 2017. The Complete Genome Sequence of the Phytopathogenic Fungus



- Sclerotinia sclerotiorum* Reveals Insights into the Genome Architecture of Broad Host Range Pathogens. *Genome Biology and Evolution*. 9(3): 593-618.
- Diaz de Ackermann, M., Oxford, R. M. Jr., Cox, D. J. and Hammond, J. J. 1988. Resistance in winter wheats to geographically differing isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* and observations of pseudoperithecia. *Plant Disease*. 72: 1028–1031.
- Diedicke, H. 1902. Ueber den Zusammenhang Zwischen *Pleospora* – und *Helminthosporium* - Arten. *Centrablatt fur Bakteriologie und Parasitenkunde Jena, Abt. 9*: 317-329.
- Diguta, C. F., Vincent, B., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H. and Rousseaux, S. 2011. PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiology*. 28(6): 1145–1154.
- Dinglasan, E. G., Godwin, I. D., Phan, H. T., Tan, K. C., Platz, G. J. and Hickey, L. T. 2018. Vavilov wheat accessions provide useful sources of resistance to tan spot (syn. Yellow spot) of wheat. *Plant Pathology*. 67(5): 1076-1087.
- Dinglasan, E., Godwin, I. D., Mortlock, M. Y. and Hickey, L. T. 2016. Resistance to yellow spot in wheat grown under accelerated growth conditions. *Euphytica*. 209(3): 693-707.
- Dinoor, A. 1974. Role of wild and cultivated plants in the epidemiology of plant diseases in Israel. *Annual Review of Phytopathology*. 12: 413-436.
- Djermoun, 2009. La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques. *Revue Nature et Technologie*. 01 : 45-53.
- Dong, S., Raffaele, S. and Kamoun, S. 2015. The two-speed genomes of filamentous pathogens: waltz with plants. *Current Opinion in Genetics and Development*. 35: 57–65.
- Dorrance, E. A., Miller, O. K. and Warren, H. L. 1999. Comparison of *Stenocarpella maydis* isolates for isozyme and cultural characteristics. *Plant Disease* .83: 675-680.
- Dos Santos, A. M. P. V., Matsumura, A. T. S. and Van Der Sand, S. T. 2002. Intraspecific genetic diversity of *Drechslera tritici-repentis* as detected by random amplified polymorphic DNA analysis. *Genetics and Molecular Biology*. 25(2): 243-250.
- Dreschler, C. 1923. Some graminicolous species of *Helminthosporium*: 1. *Journal of Agricultural Research*. 24: 641-740.
- Du Fall, L. A. and Solomon, P. S. 2013. The necrotrophic effector SnToxA induces the synthesis of a novel phytoalexin in wheat. *New Phytologist*. 200(1): 185–200.

- Dubin, H. J. 1983. Occurrence of *Pyrenophora tritici-repentis* in the Andean countries of South America. *Plant disease*. 67: 1040.
- Duguid, S. D. and Brûlé-Babel, A. L. 2001. Inheritance and interaction of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) resistance to race 2 and race 3 of *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. *Canadian Journal of Plant Science*. 81(3): 527-533.
- Dushnicky, L. G., Ballance, G. M., Sumner, M. J. and MacGregor, A. W. 1998. Detection of infection and host responses in susceptible and resistant wheat cultivars to a toxin producing isolate of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20:19-27.
- Dushnicky, L. G., MacGregor, A. W., Summer, M. J. and Ballance, G. M. 1996. Penetration and infection of susceptible and resistant wheat cultivars by a necrosis toxin producing isolate of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 18: 392-402.
- Duveiller, E. 2004. Controlling Foliar Blights of wheat in the Rice-Wheat Systems of Asia. *Plant Disease*. 88(5): 552-556.
- Duveiller, E., Kandel, Y. R., Sharma, R. C. and Shrestha, S. M. 2005. Epidemiology of foliar blights (Spot Blotch and Tan Spot) of wheat in the plains bordering the Himalayas. *Phytopathology*. 95: 248–256.
- Duveiller, E., Singh, R. P. and Nicol, J. M. 2007. The Challenges of maintaining wheat productivity: pests, diseases, and potential epidemics. *Euphytica*. 157(3): 417-430.
- Effertz, R. J., Anderson, J. A. and Francl, L. J. 1998. QTLs associated with resistance to chlorosis induction by *Pyrenophora tritici-repentis* in adult wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 438-439.
- Effertz, R. J., Anderson, J. A. and Francl, L. J. 2001. Restriction fragment length polymorphism mapping of resistance to two races of *Pyrenophora tritici-repentis* in adult and seedling wheat. *Phytopathology*. 91: 572-578.
- Effertz, R. J., Meinhardt, S. W., Anderson, A. J., Jordahl, J. G. and Francl, L. J. 2002. Identification of a chlorosis-inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* and the chromosomal location of an insensitivity locus in wheat. *Phytopathology*. 92(5): 527-533.
- Elias, E., Cantrell, R. G. and Hosford, R. M. Jr. 1989. Heritability of resistance to tan spot in durum wheat and its association with other agronomic traits. *Crop Science*. 29: 299–304.
- Engle J. S., Lipps P. E. and Millis D. 2004. Tan Spot: Yellow Leaf Spot or Blotch. Ed. The Ohio State University, 2p.

- Engle, J. S., Madden, L. V. and Lipps, P. E. 2006. Distribution and pathogenic characterization of *Pyrenophora tritici-repentis* and *Stagonospora nodorum* in Ohio. *Phytopathology*. 96: 1355-1362.
- Evans, C. K., Hunger, R. M. and Siegerist, W. C. 1999. Comparison of greenhouse and field testing to identify wheat resistant to tan spot. *Plant Disease*. 83: 269-273
- Faino, L., Seidl, M. F., Shi-Kunne, X., Pauper, M., van den Berg, G. C. M., Wittenberg, A. H. J. and Thomma, B. 2016. Transposons passively and actively contribute to evolution of the two-speed genome of a fungal pathogen. *Genome Research*. 26: 1091–1100.
- Faris, J. D. and Friesen, T. L. 2005. Identification of quantitative trait loci for race-nonspecific resistance to tan spot of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 111(2): 386-392.
- Faris, J. D., Anderson, J. A., Francl, L. J. and Jordahl, J. G. 1996. Chromosomal location of gene conditioning insensitivity in wheat to a necrosis-inducing culture filtrate from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology*. 86(5): 459-463.
- Faris, J. D., Anderson, J. A., Francl, L. J. and Jordahl, J. G. 1997. RFLP mapping of resistance to chlorosis induction by *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 94: 98-103.
- Faris, J. D., Liu, Z. and Xu, S. 2013. Genetics of tan spot resistance in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 126: 2197-217.
- Faris, J. D., Overlander, M. E., Kariyawasam, G. K., Carter, A., Xu, S. S. and Liu, Z. 2020. Identification of a major dominant gene for race-nonspecific tan spot resistance in wild emmer wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 133(3): 829-841.
- Faris, J. D., Zhang, Z., Lu, H., Lu, S., Reddy, L., Cloutier, S., Fellers, J. P., Meinhardt, S. W., Rasmussen, J. B., Xu, S. S., Oliver, R. P., Simons, K. J. and Friesen, T. L. 2010. A unique wheat disease resistance like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens, *The Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA*. 107(30): 13544-13549.
- Farr, D. F., Bills, G. F., Chamuris, G. P. and Rossman, A. Y. 1989. *Fungi on Plants and Plant Products in the United States*. APS Press, St Paul MN. 1252 pp.
- Fernandez, M. R., Clarke, J. M. and DePauw, R. M. 1994. Response of durum wheat kernels and leaves at different growth stages to *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Disease*. 78(6): 597-600.

- Fernandez, M. R., Clarke, J. M. and DePauw, R. M. 1998. Effects environmental variable on the development of kernel discoloration by *Pyrenophora tritici-repentis* in durum wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 104-110.
- Fernandez, M. R., DePauw, R. M., Clarke, J. M. and Lefkovitch, L. P. 1996. Read Smudge in durum wheat reduces seedling vigor. *Canadian Journal of Plant Science*. 76: 321-324.
- Figueiredo, J. G., Goulin, E. H., Tanaka, F., Stringari, D., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L. V., Staats, C. C., Schrank, A. and Glienke, C. 2010. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. *Journal of microbiological methods*. 80(2): 143-147.
- Figuroa, M., Manning, V. A., Pandelova, I. and Ciuffetti, L. M. 2015. Persistence of the host selective toxin Ptr ToxB in the apoplast. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 28(10): 1082-1090.
- Figuroa-Betts, M., Manning, V. A., Cardwell, K. B., Pandelova, I. and Ciuffetti, L. M. 2011. The importance of the N-terminus for activity of Ptr ToxB, a chlorosis-inducing host-selective toxin produced by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 75: 138-145.
- Flor, H. H. 1956. The complementary genetics systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics* 8: 29-54.
- Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology*. 9(1): 275-296.
- Francl, L. J. and Jordahl, J. G. 1992. Seed Symptomology in durum wheat. In: *Advances in Tan Spot Research*. pp. 61-64. ed. Francl J. M., Krupinsky J. M. and McMullen M. P. North Dakota Agric. Exp. Station, Fargo.
- Frandsen, R. J. N. 2011. A guide to binary vectors and strategies for targeted genome modification in fungi using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Journal of microbiological methods*. 87(3): 247-262.
- Frantzeskakis, L., Kusch, S. and Panstruga, R. 2019. The need for speed: compartmentalized genome evolution in filamentous phytopathogens. *Molecular Plant Pathology*. 20: 3-7.
- Frazzon, A. P. G., Matsumura, A. T. S. and Van Der Sand, S. T. 2002. Morphological characterisation and genetic analysis of *Drechslera teres* isolates. *Genetic and Molecular Biology*. 25(2): 235-241.

- Friesen, T. L. and Faris, J. D. 2004. Molecular mapping of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 5 and sensitivity to Ptr ToxB in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 109(3): 464-471.
- Friesen, T. L. and Faris, J. D. 2010. Characterization of the wheat-*Stagonospora nodorum* disease system: what is the molecular basis of this quantitative necrotrophic disease interaction? *Canadian Journal of Plant Pathology*. 32(1): 20–28.
- Friesen, T. L., Ali, S., Kinan, S., Francl, L. J., and Rasmussen, J. B. 2003. Role of host sensitivity to Ptr ToxA in development of tan spot of wheat. *Phytopathology*. 93(4): 397- 401.
- Friesen, T. L., Ali, S., Klein, K. K. and Rasmussen, J. B. 2005. Population genetic analysis of a global collection of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. *Phytopathology*. 95(10): 1144-1150.
- Friesen, T. L., Faris, J. D., Solomon, P. S. and Oliver, R. P. 2008. Host specific-toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cellular Microbiology*. 10(7): 1421-1428.
- Friesen, T. L., Holmes, D. J., Bowden, R. L. and Faris, J. D. 2018. ToxA is present in the US *Bipolaris sorokiniana* population and is a significant virulence factor on wheat harboring *Tsn1*. *Plant disease*. 102(12): 2446-2452.
- Friesen, T. L., Rasmussen, J. B., Kwon, C. Y., Ali, S., Francl, L. J. and Meinhardt, S. W. 2002. Reaction of Ptr ToxA-insensitive wheat mutants to *Pyrenophora tritici-repentis* race 1. *Phytopathology*. 92: 38-42.
- Friesen, T. L., Stukenbrock, E. H., Liu, Z., Meinhardt, S., Ling, H., Faris, J. D., Rasmussen, J. B., Solomon, P. S., McDonald, B. A. and Oliver, R. P. 2006. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nature Genetics*. 38(8): 953-956.
- Frisvad, J. C., Bridge, P. D. and Arora, D. K. 1998. Chemical fungal taxonomy (pp. 289-319). New York: Marcel Dekker.
- Gamba, F. M. and Lamari, L. 1998. Mendelian inheritance of resistance to tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) in selected genotypes of durum wheat (*Triticum turgidum*). *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 408–414.
- Gamba, F. M., Bassi, F. M. and Finckh, M. R. 2017. Race structure of *Pyrenophora tritici-repentis* in Morocco. *Phytopathologia Mediterranea*. 56(1): 119-126.

- Gamba, F. M., Lamari, L. and Brlé-Baabel, A. L. 1998. Inheritance of race-specific necrotic and chlorotic reactions induced by *Pyrenophora tritici-repentis* in hexploid wheats. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 401-407.
- Gamba, F. M., Strelkov, S. E. and Lamari, L. 2012. Virulence of *Pyrenophora tritici-repentis* in the Southern Cone Region of South America. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 34(4): 545-550.
- Getachew, A., Abejew, T. A., Wu, J., Xu, J., Yu, H., Tan, J., Wu, P., Tu, Y., Kang, W., Wang, Z. and Xu, S. 2020. Transcriptome profiling reveals insertional mutagenesis suppressed the expression of candidate pathogenicity genes in honeybee fungal pathogen, *Ascosphaera apis*. *Scientific Reports*. 10(1): 7532.
- Ghaderi, F., Sharifnabi, B., Javan-Nikkhah, M., Brunner, P. C. and McDonald, B. A. 2020. *SnToxA*, *SnTox1* and *SnTox3* originated in *Parastagonospora nodorum* in the Fertile Crescent. *Plant Pathology*. 69: 1482-1491.
- Gilchrist, S. L. 1992. Resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in CIMMYT bread wheat germplasm. In: Francl, L. J., Krupinsky, J. M. and McMullen, M. P. (eds) *Advances in Tan Spot Research: Proceedings of 2nd International Tan Spot Workshop*. North Dakota State University, Fargo, North Dakota.
- González, J. and Petrov, D. A. 2012. Evolution of genome content: population dynamics of transposable elements in flies and humans. *Methods in Molecular Biology*. 855: 361–383.
- Gorji, A. M., Poczai, P., Polgar, Z. and Taller, J. 2011. Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. *American Journal of Potato Research*. 88(3): 226-237.
- Grandaubert, J., Balesdent, M. H. and Rouxel, T. 2013. Incidence des Éléments Transposables sur l'évolution des génomes des champignons phytopathogènes et sur leur potentiel adaptatif. *Biologie Aujourd'hui*. 207(4): 277-290.
- Grandaubert, J., Lowe, R. G. T., Soyer, J. L., Schoch, C. L., Van de Wouw, A. P., Fudal, I., Robbertse, B., Lapalu, N., Links, M. G., Ollivier, B., Linglin, J., Barbe, V., Mangenot, S., Cruaud, C., Borhan, H., Howlett, B. J., Balesdent, M-H. and Rouxel, T. 2014. Transposable element-assisted evolution and adaptation to host plant within the *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* species complex of fungal pathogens. *BMC Genomics*. 15(1): 891-918.

- Guo, J., Shi, G. and Liu, Z. 2018. Characterizing virulence of the *Pyrenophora tritici-repentis* isolates lacking both ToxA and ToxB genes. *Pathogens*. 7: 74-84.
- Gurr, S. J., Unkles, S. E. and Kinghorn, J. R. 1987. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In *Gene Structure in Eukaryotic Microbes*, J. R. Kinghorn, ed (Oxford, UK: IRL Press), pp. 93-139.
- Gurung, S., Bonman, J. M., Ali, S., Patel, J., Myrfield, M., Mergoum, M., Singh, P. K. and Adhikari, T. B. 2009. New and diverse sources of multiple disease resistance in wheat. *Crop Science*. 49: 1655-1666.
- Gurung, S., Mamidi, S., Bonman, J. M., Xiong, M., Brown-Guedira, G. and Adhikari, T. B. 2014. Genome wide association study reveals novel quantitative trait loci associated with resistance to multiple leaf spot diseases of spring wheat. *PLoS ONE*. 9.
- Gurung, S., Short, D. P. G. and Adhikari, T. B., 2013. Global population structure and migration patterns suggest significant population differentiation among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Fungal Genetics and Biology*. 52: 32-41.
- Hacquard, S., Kracher, B., Maekawa, T., Vernaldi, S., Schulze-Lefert, P., and van Themaat, E. V. L. 2013. Mosaic genome structure of the barley powdery mildew pathogen and conservation of transcriptional programs in divergent hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(24): E2219-E2228.
- Hafez, M., Gourlie, R., Despins, T., Turkington, T. K., Friesen, T. L. and Aboukhaddour, R. 2020 *Parastagonospora nodorum* and Related Species in Western Canada: Genetic Variability and Effector Genes. *Phytopathology*. 110(12): 1946-1958.
- Hamon C., Coyne C.J., McGee R.J., Lesné A., Esnault R., Mangin P., Hervé M., Le Goff I., Deniot G., Roux-Duparque M., Morin G., McPhee K.E., Delourme R., Baranger A., Pilet-Nayel M.-L., 2013. QTL meta-analysis provides a comprehensive view of the moderately low diversity of loci controlling partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in four pea sources of resistance. *BMC Plant Biology* 13: 45.
- Harlan, J. R. 1987. Center of origin. In: *CRC Handbook of plant science in Agriculture* Pages 15-21. Vol 1. B.R. Christie. ed. CRC press, Boca Rton. F. L.
- Hershman, D. E. and Vincelli, P. 1997. *Kentucky Plant Disease Management Guide for Small Grains*. Ed. University of Kentucky, USA, 6p.

- Hickey, L. T., Wilkinson, P. M., Knight, C. R., Godwin, I. D., Kravchuk, O. Y., Aitken, E. A., Bansal, U. K., Bariana, H. S., De Lacy, I. H. and Dieters, M. J. 2012. Rapid phenotyping for adult-plant resistance to stripe rust in wheat. *Plant breeding*. 131: 54-61.
- Hosford, R. M. 1971. A form of *Pyrenophora trichstoma* pathogenic to wheat and other grasses. *Phytopathology*. 61: 28-32.
- Hosford, R. M. Jr. 1982. Tan spot. In: Hosford RM, ed. *Tan Spot of Wheat and Related Diseases*. Fargo, North Dakota, USA: North Dakota State University, 1-24.
- Hosford, R. M. Jr., Jordahl, J. G. and Hammond, J. J. 1990. Effect of wheat genotypes, leaf position, growth stage, fungal isolate and wet period on tan spot lesions. *Plant disease*. 74: 385-390.
- Howard, R. J. and Morrall, R. A. A. 1975. The epidemiology of leaf spot disease in a native prairie. I. The progression of disease with time. *Canadian Journal of Botany*. 53: 1040-1050.
- Hudcovicova, M., Matusinsky, P., Gubis, J., Leisova-Svobodova, L., Heinonen, U., Ondreickova, K., Mihalik, D., Gubisova, M., Majeska, M. and Jalli, M. 2015. DNA markers for identification of *Pyrenophora tritici-repentis* and detection of genetic diversity among its isolates. *Romanian Agricultural Research*. 32: 01-10.
- Hunger, R. M. and Brown, D. A. 1987. Colony color, growth, sporulation, fungicide sensitivity, and Pathogenicity of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Disease*. 71(10): 907-910.
- Iram, S. and Ahmad, I. 2007. Foliar blight spectrum and genetic variability of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 40: 105-112.
- Jones, C. J., Edwards, K. J., Castaglione, S., Winfield, M. O., Sala, F., van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevski, A., Marmiroli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A. and Karp A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*. 3: 381-390.
- Jorgensen, L. and Olsen, L. 2007. Control of tan spot (*Drechslera tritici-repentis*) using cultivar resistance, tillage methods and fungicides. *Crop Protection*. 26: 1606-1616.
- Kader, K. A., Hunger, R. M. and Edwards, J. T. 2009. Characterization of three isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* collected from winter wheat in Oklahoma in 1983, 1996, and 2006. *Phytopathology*. 99: S60.



- Kalia, B., Bockus, W., Singh, S., Tiwari, V. K. and Gill, B. S. 2018. Mapping of quantitative trait loci for resistance to race 1 of *Pyrenophora tritici-repentis* in synthetic hexaploid wheat. *Plant Breeding*. 00: 1–7.
- Kamel, S., Cherif, M., Hafez, M., Despins, T. and Aboukhaddour, R. 2019. *Pyrenophora tritici-repentis* in Tunisia: Race Structure and Effector Genes. *Frontiers in Plant Science*. 10: 1562.
- Kano, S., Kurita, T., Kanematsu, S. and Morinaga, T. 2011. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the violet root-rot fungus, *Helicobasidium mompa*, and the effect of activated carbon. *Mycoscience*. 52(1): 24-30.
- Karelov, A. V., Kozub, N. O., Sozinov, I. O., Sozinov, O. O. and Blume, Ya. B. 2015. Allelic state of the molecular genetic markers for genes associated with sensitivity to *Pyrenophora tritici-repentis* toxins A and B and *Stagonospora nodorum* toxin A among Ukrainian common wheat cultivars. *Visnik ukrains' kogo tovaristva genetikiv i selekcioneriv*. 13(1): 11-17.
- Kariyawasam, G. K., Carter, A. H., Jack B., Rasmussen, J. B., Faris, J., Xu, S. S., Mergoum, M. and Liu, Z. 2016. Genetic relationships between race-nonspecific and race-specific interactions in the wheat–*Pyrenophora tritici-repentis* pathosystem. *Theoretical and Applied Genetics*. 129(5): 897-908.
- Kariyawasam, G. K., Hussain, W., Easterly, A., Guttieri, M., Belamkar, V., Poland, J., Venegas, J., Baenziger, S., Marais, F., Rasmussen, J. B. and Liu, Z. 2018. Identification of quantitative trait loci conferring resistance to tan spot in a biparental population derived from two Nebraska hard red winter wheat cultivars. *Molecular Breeding*. 38(11): 140.
- Kaye, C., Milazzo, J., Rozenfeld, S., Lebrun, M. H. and Tharreau, D. 2003. The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. *Fungal Genetics and Biology*. 40: 207-214.
- Keeling, P. J. and Palmer, J. D. 2008. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews. Genetics*. 9(8): 605-618.
- Kim, Y. M., Bouras, N., Kav, N. N. and Strelkov, S. E. 2010. Inhibition of photosynthesis and modification of the wheat leaf proteome by Ptr ToxB: a host-specific toxin from the fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*. *Proteomics*. 10(16): 2911-2926.
- Kim, Y. M., Aboukhaddour, R. and Strelkov, S. E. 2014. Transformation of a Ptr ToxB Nonproducing Isolate of *Pyrenophora tritici-repentis* with the ToxB Gene Confers Pathogenicity on a Toxin-Sensitive Wheat Genotype. *Crop Science*. 54(6): 2735-2744.

- Kokhmetova, A., Kremneva, O., Volkova, G., Atishova, M. and Sapakhova, Z. 2017. Evaluation of wheat cultivars growing in Kazakhstan and Russia for resistance to tan spot. *Journal of Plant Pathology*. 99: 161-167.
- Krupinsky J. M. 1982. Observation of host range of isolates of *Pyrenophora trichostoma*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 4: 42-46.
- Krupinsky, J. M. 1987. Pathogenicity on wheat of *Pyrenophora tritici-repentis* isolated from *Bromus inermis*. *Phytopathology*. 77: 760-765.
- Krupinsky, J. M. 1992a. Grass host of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Disease*. 76(1): 92-95.
- Krupinsky, J. M. 1992b. Aggressiveness of isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* obtained from wheat in the northern Great Plains. *Plant Disease*. 76(1): 87-91.
- Krupinsky, J. M. and Tanaka, D. L. 2001. Leaf spot diseases on winter wheat influenced by nitrogen, tillage, and haying after a grass-Alfalfa mixture in the conservation reserve program. *Plant Disease*. 85(7): 785-789.
- Kuttler, F. and Mai, S. 2007. Formation of non-random extrachromosomal elements during development, differentiation and oncogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 17: 56-64.
- Lamari, L. and Bernier, C. C. 1989a. Toxin of *Pyrenophora tritici-repentis* host specificity, significance in disease and inheritance of host reaction. *Phytopathology*. 79: 740-744.
- Lamari, L. and Bernier, C. C. 1989b. Virulence of isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* on 11 wheat cultivars and cytology of the differential host reactions. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 11: 284-90.
- Lamari, L. and Bernier, C. C. 1989c. Evaluation of wheat lines and cultivars to tan spot [*P. tritici-repentis*] based on lesion type. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 11: 49-56.
- Lamari, L. and Bernier, C. C. 1994. Temperature-induced resistance to tan spot *Pyrenophora tritici-repentis* of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 16(4): 279-286.
- Lamari, L. and Bernier, C. C. 1991. Genetics of tan necrosis and extensive chlorosis in tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology*. 81: 1092-1095
- Lamari, L. and Strelkov, S. E. 2010. The wheat / *Pyrenophora tritici-repentis* interaction: progress: towards an understanding of tan spot disease. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 32(1): 4-10.

- Lamari, L., Bernier, C. C. and Smith, R. B. 1991. Wheat genotypes that develop both tan necrosis and extensive chlorosis in response to isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Disease*. 75: 121-122.
- Lamari, L., Gilbert, J. and Tekauz, A. 1998. Race differentiation in *Pyrenophora tritici-repentis* and survey of physiologic variation in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 396-400.
- Lamari, L., McCallum, B. D., and DePauw, R. M. 2005a. Forensic pathology of Canadian bread wheat: The case of tan spot. *Phytopathology*. 95(2): 144-152.
- Lamari, L., Sayoud, R., Boulif, S. M., and Bernier, C. C. 1995. Identification of a new race in *Pyrenophora tritici-repentis*: Implications for the current pathotype classification system. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 17: 312-318.
- Lamari, L., Strelkov, S. E., Yahyaoui, A., Amedov, M., Saidov, M., Djunusova, M., and Koichibayev, M. 2005b. Virulence of *Pyrenophora tritici-repentis* in the countries of the Silk Road. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 27: 383-388.
- Lamari, L., Strelkov, S.E., Yahyaoui, A., Orabi, J. and Smith, R.B. 2003. The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat. *Phytopathology*. 93(4): 391-396
- Lammari, H. I. 2021. Etude de la rayure réticulée de l'orge causée par *Pyrenophora teres* (Died.) Drechsler. : Structure de la population pathogène et efficacité des traitements fongicides. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El-Harrach, Alger, Algérie. 139p.
- Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J. C., Bouizegarène, P. et Bogard, M. 2008. Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*. 23: 260-279.
- Larran, S., Simon, M. R., Moreno, M. V., Siurana, M. S. and Perello, A. 2016. Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. *Biological control*. 92: 17-23.
- Larrondo, L. F., Canessa, P., Vicuña, R., Stewart, P., Vanden Wymelenberg, A. and Cullen, D. 2007. Structure and transcriptional impact of divergent repetitive elements inserted within *Phanerochaete chrysosporium* strain RP-78 genes. *Molecular Genetics and Genomics*. 277(1): 43-55.

- Lee, T. S. and Gough, F. J. 1984. Inheritance of *Septoria* leaf blotch (*S. tritici*) and *Pyrenophora* tan spot (*P. tritici-repentis*) resistance in *Triticum aestivum* cv. Carifren 12. *Plant Disease*. 68: 848-851.
- Leisova, L., Hanzalova, A. and Kucera, L. 2008. Genetic diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates as revealed by AFLP analysis. *Journal of Plant Pathology*. 90: 233-245.
- Leisova-Svobodova, L., Hanzalova, A. and Kucera, L., 2010. The variability of a *Pyrenophora tritici-repentis* population as revealed by inter-retrotransposon amplified polymorphism with regard to the Ptr ToxA gene. *Czech Mycology*. 61(2): 125–128
- Leisova-Svobodova, L., Minarikova, V., Matusinsky, P., Hudcovicova, M., Ondreickova, K. and Gubis, J. 2014. Genetic structure of *Pyrenophora teres* net and spot populations as revealed by microsatellite analysis. *Fungal Biology*. 118: 180–192.
- Lepoint, P., Renard, M. E., Legrève, A., Duveiller, E. and Maraite, H. 2010. Genetic Diversity of the Mating Type and Toxin Production Genes in *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology*. 100(5): 474-483.
- Li, H. B., Yan, W., Liu, G. R., Wen, S. M. and Liu, C. J. 2011. Identification and validation of quantitative trait loci conferring tan spot resistance in the bread wheat variety Ernie. *Theoretical and Applied Genetics*. 122: 395-403.
- Lichter, A., Gaventa, J. M. and Ciuffetti, L. M. 2002. Chromosome based molecular characterization of pathogenic and nonpathogenic wheat isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Fungal Genetics and Biology*. 37: 180-189.
- Lievens, B., Houterman, P. M. and Rep, M. 2009. Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other *formae speciales*. *FEMS microbiology letters*. 300(2): 201-215.
- Lilly, V. G. and Barnett, H. L. 1951. *Physiology of the fungi*. McGrawHill, New York.
- Linde, C. C. 2010. Population genetic analyses of plant pathogens: new challenges and opportunities, *Australian Plant Pathology*. 39: 23–28.
- Linde, C. C., Zhan, J. and McDonald, B. A. 2002. Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: From lesions to continents. *Phytopathology*. 92(9): 946-955.
- Liu, T., Liu, L., Jiang, X., Hou, J., Fu, K., Zhou, F. and Chen, J. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation as a useful tool for the molecular genetic study of the phytopathogen *Curvularia lunata*. *European journal of plant pathology*. 126(3): 363-371.

- Liu, Y., Zhang, O., Salsman, E., Fiedler, J. D., Hegstad, J. B., Liu, Z., Faris, J. D., Xu, S. S. and Li, X. 2019. QTL mapping of resistance to tan spot induced by race 2 of *Pyrenophora tritici-repentis* in tetraploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 133(2): 433-442.
- Liu, Z. H., Zhong, S., Stasko, A. K., Edwards, M. C. and Friesen, T. L. 2012. Virulence profile and genetic structure of a North Dakota population of *Pyrenophora teres* f. *teres*, the causal agent of net form net blotch of barley. *Phytopathology*. 102: 539–546.
- Liu, Z., El-Basyoni, I., Kariyawasam, G., Zhang, G., Fritz, A., Hansen, J.M., Marias, F., Fiskop, A., Chao, S., Akhunov, E. and Baenziger, P. S. 2015. Evaluation and association mapping of resistance to tan spot and *Stagonospora nodorum* blotch in adapted winter wheat germplasm. *Plant Disease*. 99: 1333–1341
- Liu, Z., Friesen, T. L., Ling, H., Meinhardt, S. W., Oliver, R. P., Rasmussen, J. B. and Faris, J. D. 2006. The *Tsn1–ToxA* interaction in the wheat–*Stagonospora nodorum* pathosystem parallels that of the wheat-tan spot system. *Genome*. 49: 1265–1273.
- Liu, Z., Zurn J. D., Kariyawasam, G., Faris, J. D., Shi, G., Hansen, J., Rasmussen, J. B. and Acevedo, M. 2017. Inverse gene-for-gene interactions contribute additively to tan spot susceptibility in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 130(6): 1267-1276.
- Lorang, J., Kidarsa, T., Bradford, C. S., Gilbert, B., Curtis, M., Tzeng, S-C., Maier, C. S. and Wolpert, T. J. 2012. Tricking the Guard: Exploiting Plant Defense for Disease Susceptibility. *Science*. 338: 659–662.
- Loughman, R. and Deverall, B. J. 1986. Infection of resistant and susceptible cultivars of wheat by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Pathology*. 35: 443-450.
- Lu, S., Faris, J. D., Sherwood, R., Friesen, T. L. and Edwards, M. C. 2014. A dimeric PR-1-type pathogenesis-related protein interacts with ToxA and potentially mediates ToxA-induced necrosis in sensitive wheat. *Molecular plant pathology*. 15(7): 650-663.
- Lu, S., Gillian Turgeon, B. and Edwards, M. C. 2015. A ToxA-like protein from *Cochliobolus heterostrophus* induces light-dependent leaf necrosis and acts as a virulence factor with host selectivity on maize. *Fungal Genetics and Biology*. 81: 12-24.
- Luckow, M. 1995. Species concepts: Assumptions, methods, and applications. *Systematic Botany*. 20: 589-605.
- Luz, W. C. and Bergstrom, G. C. 1987. Interactions between *Cochliobolus sativus* and *Pyrenophora tritici-repentis* on wheat leaves. *Phytopathology*. 77: 1355-1360.

- Majer, D., Mithen, R., Lewis, B. G., Vos, P. and Oliver, R. P. 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research*. 100: 1107-1111.
- Manning, V. A. and Ciuffetti, L. M. 2005. Localization of Ptr ToxA produced by *Pyrenophora tritici-repentis* reveals protein import into wheat mesophyll cells. *Plant cell*. 17: 3203-3212.
- Manning, V. A., Hardison, L. K. and Ciuffetti, L. M. 2007. Ptr ToxA interacts with a chloroplast-localized protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20: 168-177.
- Manning, V. A., Pandelova, I., Dhillon, B., Wilhelm, L. J., Goodwin, S. B., Berlin, A. M., Figueroa, M., Freitag, M., Hane, J. K., Henrissat, B., Holman, W. H., Kodira, C. D., Martin, J., Oliver, R. P., Robbertse, B., Schackwitz, W., Schwartz, D. C., Spatafora, J. W., Turgeon, B. G., Yandava, C., Young, S., Zhou, S., Zeng, Q., Grigoriev, I. V., Ma, L.-J., and Ciuffetti, L. M. 2013. Comparative genomics of a plant-pathogenic fungus, *Pyrenophora tritici-repentis*, reveals transduplication and the impact of repeat elements on pathogenicity and population divergence. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 3(1): 41-63.
- Manning, V. and Ciuffetti, L. M. 2015. Necrotrophic effector epistasis in the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction. *PLoS ONE*. 10: e0123548.
- Martinez, J. P., Oesch, N. V. and Ciuffetti, L. M. 2004. Characterization of the multiple copy host selective toxin gene, *ToxB* in Pathogenic and non-pathogenic isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17(5): 467-474
- Martinez, J. P., Ottum, S. A., Ali, S., Francl, L. J., and Ciuffetti, L. M. 2001. Characterization of the *ToxB* gene from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14(5): 675-677.
- Mason, A. S. 2015. SSR Genotyping. In: Batley J, editor. *Plant Genotyping*. Springer; New York, NY. pp. 77-89.
- Mavragani, D., Hamel, C. and Vujanovic, V., 2011. Species-specific PCR-DGGE markers to distinguish *Pyrenophora* species associated to cereal seeds. *Fungal Biology*. 115: 169-175.
- McCartney, H. A., Foster, S. J., Fraaije, B. A. and Ward, E., 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science*. 59: 129-142.
- McDonald, B. A. 1997. The population genetics of fungi: tools and technique. *Phytopathology*. 87(4): 448-453.

- McDonald, B. A. and Linde, C. 2002. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica*. 124: 163-180.
- McDonald, B. A., McDermott, J. M., Goodwin, S. B. and Allard, R. W. 1989. The population biology of host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 27: 77-94.
- McDonald, M. C., Ahren, D., Simpfendorfer, S., Milgate, A. and Solomon, P. S. 2017. The discovery of the virulence gene *ToxA* in the wheat and barley pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Molecular Plant Pathology*. 19(2): 432-439.
- McDonald, M. C., Oliver, R. P., Friesen, T. L., Brunner, P. C. and McDonald, B. A. 2013. Global diversity and distribution of three necrotrophic effectors in *Phaeosphaeria nodorum* and related species. *New Phytologist*. 199(1): 241-251.
- McDonald, M. C., Taranto, A. P., Hill, E., Schwessinger, B., Liu, Z., Simpfendorfer, S., Milgate, A. and Solomon, P. S. 2019. Transposon-mediated horizontal transfer of the host-specific virulence protein ToxA between three fungal wheat pathogens. *mBio*. 10(5): e01515-19.
- McDonald, W. C. 1967. Variability and inheritance of morphological mutants in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology*. 57: 747-755.
- McIntosh, R. A., Hart, G. E., Devos, K. M., Gale, M. D. and Rogers, W. J. (August) 1998. Catalogue of gene symbols for wheat. In *Proceedings of the 9th International Wheat genetics symposium* (Vol. 5). Saskatoon, SK, Canada: University Extension Press, University of Saskatchewan. 562p.
- McIntosh, R. A., Yamazaki, Y., Dubcovsky, J., Rogers, J., Morris, C., Somers, D.J., Appels, R. and Devos, K. M. 2008. Catalogue of gene symbols for wheat. MacGene 2008. <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/Triticum/wgc/2008/>
- McMullen, M., 2003. Tan spot and Septoria/Stagonospora diseases of wheat: causal organisms, symptoms, survival and Spread, Management. Ed. North Dakota State University, 8p.
- Mehta, D., Voisey, J., Bruenig, D., Harvey, W., Morris, C. P., Lawford, B. and Young, R. McD. 2018. Transcriptome analysis reveals novel genes and immune networks dysregulated in veterans with PTSD. *Brain, Behavior and Immunity*. 0–1.
- Mehta, Y. R., Mehta, A. and Riede, C. R. 2004. Molecular and pathogenic variability of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates causing tan spot of wheat in the state of Parana, Brazil. *Summa Phytopathologica*. 30: 436- 444.

- Mergoum, M., Frohberg, R. C., Ali, S., Singh, P. K., Rasmussen, J. B. and Miller, J. D. 2006. Registration of Spring Wheat Germplasm ND 735 Combining Tan Spot, Leaf, and Stem Rusts. *Crop Science*. 46: 1003-1004.
- Michielse, C. B., Hooykaas, P. J. J., van den Hondel, C. A. M. J. and Ram, A. F. J. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*. 48(1): 1-17.
- Mikhailova, L. A., Mironenko, N. V. and Kovalenko, N. M. 2014. Populations of *Pyrenophora tritici-repentis* in the North Caucasus and North-West Russia: the racial composition and dynamics of virulence. *Mikologiya I Fitopatologiya*. 48(6): 393-400.
- Mironenko, N. V., Baranova, O. A., Kovalenko, N. M. and Mikhailova, L. A. 2015. Frequency of ToxA gene in North Caucasian and North-West Russian populations of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Mikologiya I Fitopatologiya*. 49: 325-329.
- Mironenko, N. V., Baranova, O. A., Kovalenko, N. M. and Mitrofanova, O. P. 2019. Interaction of the *Tsn1* and *Tsc2* sensitivity genes with the *ToxA* and *ToxB*. *Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology*. 15: 64–65
- Mironenko, N., Timopheeva, E., Mikhailova, L., Kopahnke, D., Krämer, I. and Ordon, F. 2007. Intraspecific genetic diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs.(*Drechslera tritici-repentis* [Died.] Shoem.) detected by random amplified polymorphic DNA assays. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 40: 431-440.
- Mitra, M. 1934. A leaf spot disease of wheat caused by *Helminthosporium tritici-repentis* Died. *Indian Journal of Agricultural Science*. 4: 692-700.
- Moffat, C. S. and Santana, F. 2018. Diseases affecting wheat: tan spot. In *Integrated Disease Management of Wheat and Barley*. Chap. 5, ed. R. Oliver (Burleigh Dodds Series in Agricultural Science).
- Moffat, C. S., See, P. T. and Oliver, R. P. 2014. Generation of a ToxA knockout strain of the wheat tan spot pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular plant pathology*. 15: 918-926.
- Moller, H. D., Parsons, L., Jorgensen, T. S., Botstein, D. and Regenberg, B. 2015. Extrachromosomal circular DNA is common in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112: E3114–E3122.



- Moller, M. and Stukenbrock, E. H. 2017. Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. 15(12): 756.
- Momeni, H., Aboukhaddour, R., Javan-Nikkhah, M., Razavi, M., Naghavi, M. R., Akhavan, A. and Strelkov, S. E. 2014. Race identification of *Pyrenophora tritici-repentis* in Iran. *Journal of plant pathology*. 96(2): 287-294.
- Moolhuijzen, P., See, P. T., Hane, J. K., Shi, G., Liu, Z., Oliver, R. P. and Moffat, C. S. 2018. Comparative genomics of the wheat fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* reveals chromosomal variations and genome plasticity. *BMC Genomics*. 19(1): 279.
- Moore, D. and Frazer, L. N. 2002. Essential Fungal Genetics. Ed. Springer Verlag, New York.
- Moreno, M. V., Stenglein, S. A. and Perello, A. E. 2012. *Pyrenophora tritici-repentis*, Causal Agent of Tan Spot: A Review of Intraspecific Genetic Diversity. *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity*. 297-330.
- Moreno, M. V., Stenglein, S. A., Ballati, P. A. and Perello, A. E. 2008a. Pathogenic and molecular variability among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat in Argentina. *European Journal of Plant pathology*. 122: 239-252.
- Moreno, M. V., Tacalitti, M. S., Castro, A. M. and Perello, A. E. 2008b. Isozyme polymorphisms within population *Pyrenophora tritici-repentis* in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 849-860.
- Moriwaki, J., Sato, T. and Tsukiboshi, T. 2003. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum baninense* sp. nov from Japan. *Mycoscience*. 44: 47-53.
- Mourier, T. 2016. Transposable elements and circular DNAs. *Mobile Genetic Elements*. 6: e1240748.
- Mundt, C. C. 2009. Importance of autoinfection to the epidemiology of polycyclic, foliar disease. *Phytopathology*. 99: 1116–1120.
- Nagle, B. J., Frohberg, R. C. and Hosford, R. M. 1982. Inheritance of resistance to tan spot of wheat. In: Tan spot of wheat and related disease workshop. Ed. Hosford, R. M. North Dakota State University, Fargo.
- Nakamura, M., Kuwahara, H., Onoyama, K. and Iwai, H. 2012. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for investigating pathogenicity genes of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum sansevieriae*. *Current microbiology*. 65(2): 176-182.

- Nath, V. S., Hegde, V., Jeeva, M. L., Misra, R. S., Veena, S. S., Raj, M. and Sankar, D. S. 2013. Genetic Diversity of *Phytophthora colocasiae* Causing Taro Leaf Blight: Analysis Using Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism. *Journal of Root Crops*. 39 (2): 168-177.
- Navathe, S., Yadav, P. S., Chand, R., Mishra, V. K., Vasistha, N. K., Meher, P. K., Joshi, A. K. and Gupta, P. K., 2020. *ToxA-Tsn1* interaction for spot blotch susceptibility in Indian wheat: an example of inverse gene-for-gene relationship. *Plant Disease*. 104: 71-81.
- Nelson, R. R. and Tung, G. 1973. Influence of some climatic factors on sporulation by an isolate of race T of *Helminthosporium maydis* on a susceptible male-sterile corn hybrid. *Plant disease reports*. 57: 304-307.
- Neu, C. N. S. and Keller, B. 2002. Genetic mapping of the *Lr20-Pm1* resistance locus reveals suppressed recombination on chromosome arm 7AL in hexaploid wheat. *Genome*. 45:737-744.
- Ng, W. N. and Tan, S.G. 2015. Inter- Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right?. *ASM Science Journal*. 9: 30-39.
- Nisikado, Y. 1928. Preliminary notes on yellow leaf spot diseases of wheat caused by *Helminthosporium tritici-vulgaris* Nisikado. *Institute of Agriculture and Biology*. 4: 103-109.
- Noriel, A. J., Sun, X., Bockus, W. and Bai, G. 2011. Resistance to tan spot and insensitivity to Ptr ToxA in wheat. *Crop science*. 51: 1059-1067.
- Ohm, R. A., Feu, N., Henrissat, B., Schoch, C. L., Horwitz, B. A., Barry, K. W., Condon, B. J., Copeland, A. C., Dhillon, B., Glaser, F., Hesse, C. N., Kosti, I., LaButti, K., Lindquist, E. A., Lucas, S., Salamov, A. A., Bradshaw, R. E., Ciuffetti, L., Hamelin, R. C., Kema, G. H., Lawrence, C., Scott, J. A., Spatafora, J. W., Turgeon, B. G., de Wit, P. J., Zhong, S., Goodwin, S. B. and Grigoriev, I. V. 2012. Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen Dothideomycetes fungi. *PLoS Pathogens*. 8: e1003037.
- Oliver, R. P. 2008. Plant breeding for disease resistance in the age of effectors. *Phytoparasitica*. 37: 1-5.
- Oliver, R. P. and Solomon, P. S. 2008. Recent fungal diseases of crop plants: is lateral gene transfer a common theme?. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 21(3): 287-293.
- Oliver, R. P. and Solomon, P. S. 2010. New developments in pathogenicity and virulence of necrotrophs. *Current opinion in Plant Biology*. 13: 1-5.

- Oliver, R. P., Friesen, T. L., Faris, J. D. and Solomon, P. S., 2012. *Stagonospora nodorum*: from pathology to genomics and host resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 50: 23-43.
- Oliver, R. P., Lord, M., Rybak, K., Faris, J. D. and Solomon, P. S. 2008. Emergence of tan spot disease caused by toxigenic *Pyrenophora tritici-repentis* in Australia is not associated with increased deployment of toxin sensitive cultivars. *Phytopathology*. 98(5): 488-491.
- Oliver, R., Lichtenzveig, J., Tan, K. C., Waters, O., Rybak, K., Lawrence, J., Friesen, T. and Burgess, P. 2014. Absence of detectable yield penalty associated with insensitivity to Pleosporales necrotrophic effectors in wheat grown in the West Australian wheat belt. *Plant Pathology*. 63: 1027–1032.
- Orbach, M. J., Farrall, L., Sweigard, J. A., Chumley, F. G. and Valent, B. 2000. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. *The Plant Cell*. 12(11): 2019-2032.
- Orolaza, N. P., Lamari, L., Ballance, G. M. 1995. Evidence of a host-specific chlorosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*, the causal agent of tan spot of wheat. *Phytopathology*. 85(10): 1282-1287.
- Ouar, N., Benbelkacem, A., Singh, P. K., Oumata, S. and Benslimane, H. 2021. Reaction of Algerian and international germplasm of wheat against races 1 and 5 of *Pyrenophora tritici-repentis* the causal agent of tan spot. *Cereal Research communications*. <https://doi.org/10.1007/s42976-021-00161-1>
- Oumata, S., David, J., Mekliche-Hanifi, L., Kharsi, M., Zaharieva, M. and Monneveux, P. 2020. Oasis wheats of the South of Algeria: landraces, cultural practices and utilization. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 67(2): 325-337.
- Pandelova, I., Figueroa, M., Wilhelm, L. J., Manning, V. A., Mankaney, A. N., Mockler, T. C. and Ciuffetti, L. M. 2012. Host-selective toxins of *Pyrenophora tritici-repentis* induce common responses associated with host susceptibility. *PLoS One*. 7: e40240.
- Parmasto, E. and Parmasto, I. 1992. Size and shape of basidiospores in the Hymenomycetes, *Mycologia Helvetica*. 5: 47-78.
- Parrent, J. L., Garbelotto, M. and Gilbert, G. S. 2004. Population genetic structure of the polypore *Datronia caperata* in fragmented mangrove forests. *Mycological Research*. 108: 403-410.

- Patel, J. S., Mamidi, S., Bonman, J. M. and Adhikari, T. B. 2013. Identification of QTL in spring wheat associated with resistance to a novel isolate of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Crop Science*. 53: 842-852.
- Peltonen, S., Jalli, M., Kammiovirta, K. and Karjalainen, R., 1996. Genetic variation in *Drechslera teres* population as indicated by RAPD markers. *Annals of Applied Biology*. 128: 465-477.
- Perello, A. E. and Dal Bello, G. M. 2011. Suppression of tan spot and plant growth promotion of wheat by synthetic and biological inducers under field conditions. *Annals of Applied Biology*. 158(3): 267-274.
- Perello, A. E., Monaco, C., Simon, M. R., Sisterna, M. and Dal Bello, G. S. 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. *Crop protection*. 22(9): 1099-1106.
- Perello, A., Moreno, M. V., Monaco, C. and Simon, M. R. 2008. Effect of *Trichoderma* spp. Isolates for biological control of tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis* under field conditions in Argentina. *BioControl*. 53(6): 895-904.
- Pfender W. F., Pacey C. A. and Zhang W. 1988. Saprofitic growth and pseudothecia production by *Pyrenophora tritici-repentis* in plant tissue held at controlled water potentials. *Phytopathology*. 78: 1205-1210
- Pioli, R. N., Morandi, E. N., Martínez, M. C., Lucca, F., Tozzini, A., Bisaro, V. and Hopp, H. E. 2003. Morphological, molecular and pathogenic characterization of *Diaphorthe phaseolorum* variability in the core soybean-producing area of Argentina. *Phytopathology*. 93: 136-146.
- Poloni, A., Pessi, I. S., Frazzon, A. P. G. and Van Der Sand, S. T. 2009. Morphology, Physiology, and Virulence of *Bipolaris sorokiniana* Isolates. *Current Microbiology*. 59(3): 267-273.
- Qin, S., Ji, C., Li, Y. and Wang, Z. 2017. Comparative transcriptomic analysis of race 1 and race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* induced with different carbon sources. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 7(7): 2125-2138.
- Raffaele, S. and Kamoun, S. 2012. Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nature Reviews. Microbiology*. 10(6): 417-430.

- Rao, S., Sharda, S., Oddi, V. and Nandineni, M. R. 2018. The landscape of repetitive elements in the refined genome of chilli anthracnose fungus *Colletotrichum truncatum*. *Frontiers in microbiology*. 9: 2367.
- Rasmussen, B. H. 2012. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. Doi: 10.5772/37724.
- Reddy, M. P., Sarla, N. and Siddiq, E. A. 2002. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism and Its Application in Plant Breeding. *Euphytica*. 128: 9-17.
- Rees, R. G. and Platz, G. J. 1983. Effects of yellow spot on wheat: Comparison of epidemics at different stages of crop development. *Australian Journal of Agricultural Research*. 34:39-46.
- Rees, R. G. and Platz, G. J. 1990. Sources of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in bread wheats. *Euphytica*. 45: 59–69.
- Rho, H. S., Kang, S. and Lee, Y. H. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecules and Cells*. 12(3): 407-411.
- Riaz, A., Athiyannan, N., Periyannan, S., Afanasenko, O., Mitrofanova, O., Aitken, E., Lagudah, E. and Hickey, L. 2017. Mining Vavilov's treasure chest of wheat diversity for adult plant resistance to *Puccinia triticina*. *Plant Disease*. 101: 1–7.
- Riaz, M., Bockus, W. W. and Davis, M. A. 1991. Effects of wheat genotype, time after inoculation, and leaf age on conidia production by *Drechslera tritici-repentis*. *Phytopathology*. 81: 1298-1302.
- Riaz, M., Bockus, W.W. and Davis, M. A. 1991. Effects of wheat genotype, time after inoculation, and leaf age on conidia production by *Drechslera tritici-repentis*. *Phytopathology*. 81: 1298-1302
- Richards, J. K., Wyatt, N. A., Liu, Z., Faris, J. D. and Friesen, T. L. 2018. Reference quality genome assemblies of three *Parastagonospora nodorum* isolates differing in virulence on wheat. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 8(2): 393-399.
- Riede, C. R., Francl, L. J., Anderson, J. A., Jordahl, J. G. and Meinhardt, S. W. 1996. Additional sources of resistance to tan spot of wheat. *Crop Science*. 36: 771-777.
- Roca, M. G., Read, N. D. and Wheals, A. E. 2005. Conidial anastomosis tubes in filamentous fungi. *FEMS Microbiology Letter*. 249: 191-198.

- Rodriguez, R. W. and Bockus, W. W. 1996. Differences among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* in production of conidia on wheat leaves. *Plant disease*. 80(5): 478-483.
- Rohland, N. and Hofreiter, M. 2018. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques*. 42(3): 343-352.
- Rotem, J., Cohen, Y. and Bashi, E. 1978. Host and Environmental Influences on Sporulation in Vivo. *Annual Review of Phytopathology*. 16(1): 83–101.
- Rouxel, T. and Balesdent, M. H. 2005. The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Molecular Plant Pathology*. 6(3): 225-241.
- Rouxel, T., Grandaubert, J., Hane, J. K., Hoede, C., van de Wouw, A. P., Couloux, A., Dominguez, V., Anthouard, V., Bally, P., Bourras, S., Cozijnsen, A. J., Ciuffetti, L. M., Degrave, A., Dilmaghani, A., Duret, L., Fudal, I., Goodwin, S. B., Gout, L., Glaser, N., Linglin, J., Kema, G. H., Lapalu, N., Lawrence, C. B., May, K., Meyer, M., Ollivier, B., Poulain, J., Schoch, C.L., Simon, A., Spatafora, J. W., Stachowiak, A., Turgeon, B. G., Tyler, B. M., Vincent, D., Weissenbach, J., Amselem, J., Quesneville, H., Oliver, R. P., Wincker, P., Balesdent, M. H. and Howlett, B. J., 2011. Effector diversification within compartments of the *L. maculans* genome affected by Repeat-Induced Point Mutations. *Nature Communications*. 2: 202.
- Sarma, G. N., Manning, V. A., Ciuffetti, L. M. and Karplus, P. A. 2005. Structure of Ptr ToxA: An RGD-Containing Host-Selective Toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *The Plant Cell*. 17(11): 3190-3202.
- Sarova, J., Hanzalova, A. and Bartos, P. 2005. Races of *Pyrenophora tritici-repentis* in the Czech Republic. *Acta Agrobotanica*. 58: 73-78.
- Sarova, J., Sip, V. and Hanzalova, A. 2002. Response of winter wheat cultivars to artificial infection with *Pyrenophora tritici-repentis* in field and greenhouse conditions. *Plant Protection Science*. 38: 575–579
- Schardl, C. L., Florea, S., Pan, J., Nagabhyru, P., Bec, S. and Calie, P. J. 2013. The epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Current opinion in plant biology*. 16(4): 480-488.
- Schilder, A. M. C. and Bergstrom, G. C. 1990. Variation in virulence within the population of *Pyrenophora tritici-repentis* in New York. *Phytopathology*. 80(1): 84-90.

- Schilder, A. M. C. and Bergstrom, G. C. 1992. The dispersal of conidia and ascospores of *Pyrenophora tritici-repentis*. In: Advances in tan spot research, Francl L.J., Krupinsky J. M. and McMullen M. P., (eds.) Proceedings of 2<sup>nd</sup> Tan Spot Workshop, North Dakota Agric Exp. Station, Fargo, USA, 1992: 96-99.
- Schilder, A. M. C. and Bergstrom, G. C. 1993. Tan spot. *Seed borne diseases and seed health testing of wheat*. 113-122.
- Schilder, A. M. C. and Bergstrom, G. C. 1994. Infection of Wheat seed by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Botany*. 72: 510-519.
- Schilder, A. M. C. and Bergstrom, G. C. 1995. Seed transmission of *Pyrenophora tritici-repentis*. *European Journal of Plant Pathology*. 101: 81-91.
- Scott, J. B. and Chakraborty, S. 2008. Identification of 11 polymorphic simple sequence repeat loci in the phytopathogenic fungus *Fusarium pseudograminearum* as a tool for genetic studies. *Molecular Ecology Resources*. 8: 628-630.
- See, P. T., Iagallo, E. M., Oliver, R. P. and Moffat, C. S. 2019. Heterologous expression of the *Pyrenophora tritici-repentis* effector proteins ToxA and ToxB, and the prevalence of effector sensitivity in Australian cereal crops. *Frontiers in microbiology*. 10: 182.
- See, P. T., Marathamuthu, K. A., Iagallo, E. M., Oliver, R. P. and Moffat, C. S. 2018. Evaluating the importance of the tan spot ToxA-*Tsn1* interaction in Australian wheat varieties. *Plant Pathology*. 67(5): 1066-1075.
- Senthil, N. K. and Gurusubramanian, G. 2011. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers and Its Applications. *Science Vision*. 11 (3): 116-124.
- Shankar, M., Jorgensen, D., Taylor, J., Chalmers, K. J., Fox, R., Hollaway, G. J., Neate, S. M., McLean, M. S., Vassos, E., Golzar, H., Loughman, R. and Mather, D. E., 2017. Loci on chromosomes 1A and 2A affect resistance to tan (yellow) spot in wheat populations not segregating for *tsn1*. *Theoretical and Applied Genetics*. 130(12): 2637–2654.
- Shankar, M., Mather, D., Jorgensen, D., Golzar, H., Chalmers, K., Hollaway, G., McLean, M., Neate, S. and Loughman, R. 2015. Germplasm Enhancement for Resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in Wheat. In Y. Ogihara *et al.* (eds.), *Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field*, pp: 193-199.
- Sharma, R. C., Sah, S. N. and Duveiller, E. 2004. Combining ability analysis of resistance to *Helminthosporium* leaf blight in spring wheat. *Euphytica*. 136: 341–348.

- Sharma, S., Duveiller, E., Basnet, R., Karki, C. B. and Sharma, R. C. 2005. Effect of potash fertilization on *Helminthosporium* leaf blight severity in wheat, and associated increases in grain yield and kernel weight. *Field Crop Research*. 93: 142-150.
- Siedler, H., Messmer, M. M., Schachermayr, G. M., Winzeler, H., Winzeler, M. and Keller, B. 1994. Genetic diversity in European wheat and spelt breeding material based on RFLP data. *Theoretical and Applied Genetics*. 88(8): 994-1003.
- Sillero, J. C. and Rubiales, D. 2012. Identification of resistance to tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) in *Hordeum chilense* and its expression in its amphiploids with diploid, tetraploid and hexaploid *Triticum* species. *Plant breeding*. 131(5): 579-583.
- Simon, M.R.; Ayala, F., Golik, S., Terrile, I., Cordo, C., Perello, A., Moreno, V. and Chidichimo, H. 2011. Influence Integrated Foliar Disease Management to Prevent Yield Loss in Argentinian Wheat Production. *Agronomy Journal*. 103(5): 1441-1451.
- Singh, P. K. and Hughes, G. R. 2005. Genetic control of resistance to tan spot induced by *Pyrenophora tritici-repentis* race 1 and 2, in spring and winter wheat genotypes. *Phytopathology*. 95(2): 172-177.
- Singh, P. K. and Hughes, G. R. 2006. Genetic Similarity among Isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*, Causal Agent of Tan Spot of Wheat. *Journal of Phytopathology*. 154(3): 178–184.
- Singh, P. K., Duveiller, E. and Singh, R. P. 2012. Resistance Breeding for Tan Spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) of Wheat. In I. Sharma (eds) *Disease Resistance in Wheat*, pp: 136-150.
- Singh, P. K., Gonzalez-Hernandez, J. L., Mergoum, M., Ali, S., Adhikari, T. B., Kianian, S. F., Elias, E. M. and Hughes, G. R. 2006. Identification and molecular mapping of a gene in tetraploid wheat conferring resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 3. *Phytopathology*. 96(8): 885-889.
- Singh, P. K., Mergoum, M. and Hughes, G. R. 2007. Variation in virulence to wheat in *Pyrenophora tritici-repentis* population from Saskatchewan, Canada, from 2000 to 2002. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 29(2): 166-171.
- Singh, P. K., Mergoum, M., Ali, S., Adhikari, T. B. and Hughes, G. R. 2008a. Genetic analysis of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* races 1 and 5 in tetraploid and hexaploid wheat. *Phytopathology*. 98(6): 702-708.



- Singh, P. K., Mergoum, M., Gonzalez-Hernandez, J. L., Ali, S., Adhikari, T.B., Kianian, S. F., Elias, E.M. and Hughes, G. R. 2008b. Genetics and molecular mapping of resistance to necrosis inducing race 5 of *Pyrenophora tritici-repentis* in tetraploid wheat. *Molecular Breeding*. 21(3): 293-304.
- Singh, P. K., Singh, R. P., Duveiller, E., Mergoum, M., Adhikari, T. B. and Elias, E. M. 2010. Genetics of wheat-*Pyrenophora tritici-repentis* interactions. *Euphytica*. 171(1): 1-13.
- Singh, R. P. and Rajaram, S. 2002. Breeding for resistance in wheat. In: Curtis, B. C., Rajaram, S., and Gomez Macpherson, H. (eds) Bread wheat: improvement and production, plant production and protection series no. 30, FAO, Rome, pp: 317–330.
- Singh, R. P., Singh, P. K., Rutkoski, J., Hodson, D. P., He, X., Jørgensen, L. N., Hovmoller, M. S. and Huerta Espino, J. 2016. Disease impact on wheat yield potential and prospects of genetic control. *Annual review of phytopathology*. 54: 303-322.
- Singh, S., Bockus, W. W., Sharma, I. and Bowden, R. L. 2008c. A novel source of resistance in wheat to *Pyrenophora tritici-repentis* race 1. *Plant Disease*. 92(1): 91-95.
- Stakman, E. C., 1957. Problems in preventing plant disease epidemics. *American Journal of Botany*. 44: 259-267.
- Stock, W. S., Brûlé-Babel, A. L. and Penner, G. A. 1996. A gene for resistance to a necrosis-inducing isolate of *Pyrenophora tritici-repentis* located on 5BL of *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring. *Genome*. 39: 598-604.
- Strelkov, S. E. 2002. Occurrence and expression of ToxB and comparative virulence of chlorosis inducing races of *Pyrenophora tritici-repentis*. Ph.D, thesis, University of Manitoba, Winnipeg.
- Strelkov, S. E. and Lamari, L. 2003. Host-parasite interaction in tan spot *Pyrenophora tritici-repentis* of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 25: 339-349.
- Strelkov, S. E., Kowatsch, R., Ballance, G. M. and Lamari, L. 2006. Characterization of the *ToxB* gene from North African and Canadian isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 67: 164–170
- Strelkov, S. E., Lamari, L. and Ballance, G. M. 1999. Characterization of a host specific protein toxin (Ptr ToxB) from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 12(8): 728-732.

- Strelkov, S. E., Lamari, L., Sayoud, R. and Smith, R. B. 2002. Comparative virulence of chlorosis-inducing races of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 24: 29-35.
- Stukenbrock, E. H. and McDonald, B. A. 2007. Geographical variation and positive diversifying selection in the host-specific toxin SnToxA. *Molecular Plant Pathology*. 8(3): 321-332.
- Stukenbrock, E. H., Banke, S., Javan-Nikkhah, M. and McDonald, B. A. 2007. Origin and domestication of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* via sympatric speciation. *Molecular and Biology Evolution*. 24: 398-411.
- Summerell B. A. and Burgess L. W. 1989. Factors influencing survival of *Pyrenophora tritici-repentis*: Stubble management. *Mycologia Research*. 93: 38-40.
- Sun, X. C., Bockus, W. and Bai, G. 2010. Quantitative trait loci for resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 1 in a Chinese wheat. *Phytopathology*. 100: 468–473.
- Sutton, J. C. and Vyn, T. J. 1990. Crop sequences and tillage practices in relation to diseases of winter wheat in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 12(4): 358-368.
- Syme, R. A., Hane, J. K., Friesen, T. L. and Oliver, R. P. 2013. Resequencing and comparative genomics of *Stagonospora nodorum*: sectional gene absence and effector discovery. *G3 Genes, Genomes, Genetics*. 3(6): 959-969.
- Tadesse, W., Hsam, S. L. K. and Zeller, F. J. 2006a. Evaluation of common wheat cultivars for tan spot resistance and chromosomal location of a resistance gene in the cultivar ‘Salamouni’. *Plant Breeding*. 125(4): 318-322.
- Tadesse, W., Hsam, S. L. K., Wenzel, G. and Zeller F. J. 2006b. Identification and monosomic analysis of tan spot resistance genes in synthetic wheat lines (*Triticum turgidum* L. × *Aegilops tauschii* Coss.). *Crop Science*. 46(3): 1212-1217.
- Tadesse, W., Hsam, S. L. K., Wenzel, G. and Zeller, F. J. 2008. Chromosome location of a gene conferring resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in Ethiopian wheat cultivars. *Euphytica*. 162(3): 423-430.
- Tadesse, W., Reents, H. J., Hsam, S. L. K. and Zeller, F. J. 2011. Relationship of seedling and adult plant resistance and evaluation of wheat germplasm against tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 58: 339–346.

- Tadesse, W., Schmolke, M., Mohler, V., Wenzel, G., Hsam, S. L. K. and Zeller, F. J. 2007. Molecular mapping of resistance genes to tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis* race 1) in synthetic wheat lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 114: 855–862.
- Tai, Y. S., Bragg, J. and Meinhardt, S. W. 2007. Functional characterization of ToxA and molecular identification of its intracellular targeting protein in wheat. *American Journal of Plant Physiology*. 2: 76-89.
- Talbot, N. J., Ebbole, D. J. and Hamer, J. E. 1993. Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*. 5(11): 1575-1590.
- Tomas, A., Feng, G. H., Reeck, G. R., Bockus, W. W. and Leach, J. E. 1990. Purification of a cultivar specific toxin from, *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 3: 221-224.
- Tran, V. A., Aboukhaddour, R., Strelkov, I. S., Bouras, N., Spaner, D. and Strelkov, S. E. 2017. The sensitivity of Canadian wheat genotypes to the necrotrophic effectors produced by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 39(2): 149-162.
- Tsushima, A., Gan, P., Kumakura, N., Narusaka, M., Takano, Y., Narusaka, Y. and Shirasu, K. 2019. Genomic plasticity mediated by transposable elements in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*. *Genome Biology and Evolution*. 11: 1487–1500.
- Tuori, R. P., Wolpert, T. J. and Ciuffetti, L. M. 1995. Purification and immunological characterization of toxic components from cultures of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 8: 41-48.
- Vavilov, N. I. 1951. Origin, variation immunity and breeding of cultivated plants. Selected writing, Chronica Botanica Co., Waltham, 60p.
- Vechet1, L. and Vydrova, E. 2011. Differences in aggressiveness and morphology of *Mycosphaerella graminicola* isolates causal agent of septoria tritici blotch on wheat. *Journal of Agricultural Science and Technology*. A1: 386-393.
- Verscheure, M., Lognay, G. and Marlier, M. 2002. Revue bibliographique : les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 6(3): 131-142.
- Viaud, M., Pasquier, A. and Brygoo, Y. 2000. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. *Mycological Research*. 104(9): 1027–1032.

- Vieira, A. L. and Camilo, C. M. 2011. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Fungal Genetics and Biology*. 48(8): 806-811.
- Villareal, R. L., Mujeeb Kazi, A., Gilchrist, L. I. and Del Toro, E. 1995 Yield loss to spot blotch in spring bread wheat in warm non-traditional wheat production areas. *Plant Disease*. 79(9): 893-897.
- Virdi, S. K., Liu, Z., Overlander, M. E., Zhang, Z., Xu, S. S., Friesen, T. L. and Faris, J. D. 2016. New insights into the roles of host gene-necrotrophic effector interactions in governing susceptibility of durum wheat to tan spot and *Septoria nodorum* blotch. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 6(12): 4139-4150.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M. Reijans, M., Van-De-Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23: 4407-4414.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. and Barton, G. J. 2009. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. 25(9): 1189–1191.
- Wegulo, S. N. 2011. Tan spot of cereals. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2011-0426-01.
- Wegulo, S. N., Breathnach, J. A. and Baenziger, P. S. 2009. Effect of growth stage on the relationship between tan spot and spot blotch severity and yield in winter wheat. *Crop Protection*. 28(8): 696-702.
- Wegulo, S. N., Klein, R. N. and Harveson, R. M. 2006. Tan spot disease of wheat. Ed. University of Nebraska, 3p.
- Wegulo, S. N., Zwingman, M. V., Breathnach, J. A. and Baenziger, P. S. 2011. Economic returns from fungicide application to control foliar fungal diseases in winter wheat. *Crop Protection*. 30: 685-692.
- Weith, S. K. 2015. *Pyrenophora tritici-repentis* the causal agent of tan spot: characterization of New Zealand populations. Mémoire de Master, Lincoln University, Christchurch, New Zealand, 130p.
- Westrick, N. M., Ranjan, A., Jain, S., Grau, C. R., Smith, D. L. and Kabbage, M. 2019. Gene regulation of *Sclerotinia sclerotiorum* during infection of *Glycine max*: on the road to pathogenesis. *BMC Genomics*. 20(1): 157.

- Wiik, L. and Rosenqvist, H. 2010. The economics of fungicide use in winter wheat in southern Sweden. *Crop Protection*. 29(1): 11-19.
- Williams, A. H., Sharma, M., Thatcher, L. F., Azam, S., Hane, J. K., Sperschneider, J., Kidd, B. N., Anderson, J. P., Ghoch, R., Garg, G., Lichtenzveig, J., Kistler, H., C., Shea, T., Young, S., Buck, S-A. G., Kamphuis, L. G., Saxena, R., Pande, S., Ma, L-J., Varshney, R. K. and Singh, K. B. 2016. Comparative genomics and prediction of conditionally dispensable sequences in legume-infecting *Fusarium oxysporum* formae speciales facilitates identification of candidate effectors. *BMC genomics*. 17(1): 191.
- Williams, J. G. K., Kubelki, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18(22): 6531-6533.
- Wisecaver, J. H., Slot, J. C. and Rokas, A. 2014. The Evolution of Fungal Metabolic Pathways. *PLoS Genetics*. 10: e1004816.
- Wolpert, T. J., Dunkle, L. D. and Ciuffetti, L. M. 2002. Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name? *Annual Review of Phytopathology*. 40: 251-85.
- Young, R. A. and Kelly, J. D. 1997. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. *Crop Science*. 37: 940-946.
- Zaamoum, M. 2007. Caractéristique morphologique et purification partielle des composés toxiques de *Pyrenophora graminea* Ito et Kuribi. Mémoire de Magister, ENSA, El Harrach, Alger, Algérie. 71p.
- Zhang, H. F., Francl, L. J., Jordahl, J. G. and Meinhardt, S. W. 1997. Structural and physical properties of necrosis inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology*. 87(2): 154-160.
- Zhang, L., Huang, X., He, C., Zhang, Q. Y., Zou, X., Duan, K. and Gao, Q. 2018. Novel fungal pathogenicity and leaf defense strategies are revealed by simultaneous transcriptome analysis of *Colletotrichum fructicola* and strawberry infected by this fungus. *Frontiers in plant science*. 9: 434.
- Zhang, P., Liu, T. T., Zhou, P. P., Li, S. T. and Yu, L. J. 2011. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of a taxol-producing endophytic fungus, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Current microbiology*. 62(4): 1315-1320.

- Zhang, Z., Friesen, T. L., Simons, K. J., Xu, S. S. and Faris, J. D. 2009. Development, identification, and validation of markers for markerassisted selection against the *Stagonospora nodorum* toxin sensitivity genes *Tsn1* and *Snn2* in wheat. *Molecular Breeding*. 23(1): 35-49.
- Zhong, S., Steffenson, B. J., Martinez, J. P. and Ciuffetti, L. M. 2002. A molecular genetic map and electrophoretic karyotype of the plant pathogenic fungus *Cochliobolus sativus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15(5): 481-492.
- Zhong, Z., Marcel, T. C., Hartmann, F. E., Ma, X., Plissonneau, C., Zala, M., Ducasse, A., Confais, J., Compain, J., Lapalu, Nicolas., Amselem, J., McDonald, B. A., Croll, D. and Palma-Guerrero, J. 2017. A small secreted protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on wheat cultivars carrying the *Stb6* resistance gene. *New Phytologist*. 214(2): 619-631.
- Ziems, L. A., Hickey, L. T., Hunt, C. H., Mace, E. S., Platz, G. J., Franckowiak, J. D. and Jordan, D. R. 2014. Association mapping of resistance to *Puccinia hordei* in Australian barley breeding germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*. 127: 1199–1212.
- Zillinsky, F. J. 1983. Maladies communes des céréales à paille: Guide d'identification. Ed. CIMMYT, Londres, 141p.

**Site internet**

<https://www.fas.usda.gov/data>

<https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search>

---

# **Annexes**

---

**Annexe 1 : désignation, espèce hôte, origine géographique et année d'isolement des isolats collectés lors des prospections faites à travers les régions céréalières des 3 pays.**

<b>Code</b>	<b>Localité – région</b>	<b>Pays</b>	<b>Année</b>	<b>Hôte</b>
Ptr 1	Oued Athmania – Mila	Algérie	2006	Blé tendre Hiddab
Ptr 4	Berboucha – Tipaza			Blé dur Vitron
Ptr 6	Entrée de Djendel – Ain Defla			Blé dur
Ptr 9	Cherchell – Tipaza			Blé dur Vitron
Ptr 10	Oued Smar – Alger			Blé dur Chen's
Ptr 11	Oued El-Alleug – Blida			Blé dur Chen's
Ptr 16	Ahmer El-Aïn – Tipaza			Blé tendre Hiddab
Ptr 17	Mouzaia – Blida			Blé tendre Hiddab
Ptr 18	El-Harrach – Alger			Blé tendre Hiddab
Ptr 21	El Kseur – Bejaia			Blé dur
Ptr 22	Guelma			Blé dur
Ptr 23	Iaazougen –Tizi Ouzou			Blé dur
Ptr 24	Laadjel d'Iaazougen – Tizi Ouzou			Blé dur Vitron
Ptr 26	Maskara			Blé dur Waha
Ptr 34	Tagherzourt – Bouira			Blé dur Waha
Ptr 36	El-khroub – Constantine			Blé dur
Ptr 37	Ibn Ziad – Constantine			Blé dur
Ptr 38	Berrouaghia – Médéa			Blé tendre



Ptr 42	Beni Slimane – Médéa			Blé tendre Anza
Ptr 45	Grarem Gouga – Mila			Blé dur Bidi 17
Ptr 46	Grarem Gouga – Mila			Blé dur
Ptr 50	Station ENSA – Alger			Blé dur Semeto
Ptr 51	M'herza – Ain Defla			Blé dur
Ptr 52	Beni Mestina – Constantine			Blé tendre Hiddab
Ptr 53	Ain Sbaa – Bouira			Blé tendre Hiddab
Ptr 55	Oued Smar – Alger			Blé tendre Hiddab
Ptr 56	Oued Smar – Alger			Blé tendre
Ptr 61	Oued El-Berdi – Bouira			Blé tendre
Ptr 62	Ain Laloui – Bouira			Blé dur
Ptr 63	Oued El-khal – Bouira			Blé tendre
Ptr 64	El-Hachimia – Bouira			Blé dur
Ptr 65	Saïd Abid – Bouira			Blé dur
Ptr 66	Saïd Abid – Bouira			Blé tendre
Ptr 67	Tipaza			Blé dur
Ptr 68	Tipaza			Blé dur
Ptr 72	Area 4 – Boumerdès			Blé dur
Ptr 73	Ahmer El-Ain – Tipaza			Blé dur
Ptr 76	Ahmer El-Ain – Tipaza			Blé dur
Ptr 77	Oued Smar – Alger			Blé tendre Hiddab
Ptr 78	Oued Smar – Alger			Blé tendre Hiddab
Ptr 79	Oued Smar – Alger			Blé tendre Hiddab

Algérie

2007

Ptr 80	Ain Bessem – Bouira			Blé tendre
Ptr 81	Ain Bessem – Bouira			Blé tendre
Ptr 82	Ain Bessem – Bouira			Blé tendre
7.1	Syrie			Blé
7.2	Syrie			Blé
7.3	Syrie			Blé
7.4	Al-Ghab – Hama			Blé
7.5	Syrie			Blé
12.1	Hama			Blé
12.3	Syrie			Blé
27.1	Syrie			Blé
27.2	Al-Ghab – Hama			Blé
27.5	Syria			Blé
27.6	Syrie			Blé
27.7	Syrie			Blé
27.8	Al-Ghab – Hama	Syrie	2011	Blé
27.11	Al-Ghab – Hama			Blé
28.1	Syrie			Blé
28.2	Al-Ghab – Hama			Blé
28.6	Al-Ghab – Hama			Blé
28.8	Al-Ghab – Hama			Blé
28.9	Al-Ghab – Hama			Blé
37.1	Ras Al-Ine – Alkamichli – Al-Hasakah			Blé
37.2	Ras Al-Ine – Alkamichli – Al-Hasakah			Blé
37.3	Ras Al-Ine – Alkamichli – Al-Hasakah			Blé
39.1	Ras Al-Ine – Alkamichli – Al-Hasakah			Blé
39.2	Syrie			Blé
39.5	Syrie			Blé

41.4	Syrie		Blé
53.1	Syrie		Blé
53.2	Syrie		Blé
53.3	Syrie		Blé
68.2	Al-Ghab – Hama		Blé
68.3	Al-Ghab – Hama		Blé
68.4	Al-Ghab – Hama		Blé
71.3	Syrie		Blé
74.4	Syrie		Blé
75.2	Al-Ghab – Hama		Blé
75.3	Al-Ghab – Hama		Blé
75.4	Al-Ghab – Hama		Blé
75.5	Syrie		Blé
75.6	Al-Ghab – Hama		Blé
75.7	Al-Ghab – Hama		Blé
75.8	Al-Ghab – Hama		Blé
76.1	Al-Ghab – Hama		Blé
76.4	Al-Ghab – Hama		Blé
76.7	Syrie		Blé
77.1	Al-Ghab – Hama		Blé
77.3	Al-Ghab – Hama		Blé
77.4	Al-Ghab – Hama		Blé
77.5	Al-Ghab – Hama		Blé
77.6	Syrie		Blé
78.1	Syrie		Blé
78.2	Syrie		Blé
78.4	Syrie		Blé
79.1	Syrie		Blé

79.2	Syrie			Blé
79.6	Syrie			Blé
79.7	Al-Ghab – Hama			Blé
79.8	Syrie			Blé
79.10	Syrie			Blé
81.1	Tunisie			Blé
81.3	Tunisie			Blé
81.4	Tunisie			Blé
81.5	Tunisie			Blé
82.1	Tunisie			Blé
82.5	Tunisie			Blé
82.6	Tunisie			Blé
83.2	Tunisie			Blé
80.1	Tunisie			Blé
80.2	Tunisie			Blé
80.3	Tunisie			Blé
80.4	Tunisie	Tunisie		Blé
80.5	Tunisie			Blé
80.6	Tunisie			Blé
I2.4	Alger			Blé
I2.6	Alger			Blé
I2.21	Alger			Blé
I7.8	Blida			Blé
5.3	Blida			Blé
5.11	Blida			Blé
7.9	Blida			Blé
13.13	Alger			Blé
16.2	Blida			Blé
16.5	Blida			Blé

16.7	Blida			Blé
90.2	Alger			Blé
Ptr 16.1.1	Béjaïa – site 1 – spore 1			Blé
Ptr 16.1.2	Béjaïa – site 1 – spore 2			Blé
Ptr 16.1.3	Béjaïa – site 1 – spore 3			Blé
Ptr 16.2.1	El-Kseur – Béjaïa – site 1 – spore 1			Blé
Ptr 16.2.2	El-Kseur – Béjaïa – site 1 – spore 2			Blé
Ptr 16.2.3	El-Kseur – Béjaïa – site 1 – spore 3			Blé
Ptr 16.3.1	El-Kseur – Béjaïa – site 2 – spore 1			Blé
Ptr 16.3.2	El-Kseur – Béjaïa – site 2 – spore 2			Blé
Ptr 16.3.3	El-Kseur – Béjaïa – site 2 – spore 3			Blé
Ptr 16.4.2	Semaoun – Béjaïa – site 1 – spore 2			Blé
Ptr 16.4.3	Semaoun – Béjaïa – site 1 – spore 3			Blé
Ptr 16.5.1	Semaoun – Béjaïa – site 2 – spore 1			Blé
Ptr 16.5.2	Semaoun – Béjaïa – site 2 – spore 2			Blé
Ptr 16.5.3	Semaoun – Béjaïa – site 2 – spore 3			Blé
Ptr 16.6.1	El-Amra – Ain Defla – site 1 – spore 1	Algérie	2016	Blé dur Vitron
Ptr 16.6.2	El-Amra – Ain Defla – site 1 – spore 2			Blé dur Vitron
Ptr 16.6.3	El-Amra – Ain Defla – site 1 – spore 3			Blé dur Vitron
Ptr 16.7.1	El-Amra – Ain Defla – site 2 – spore 1			Blé dur Waha
Ptr 16.7.2	El-Amra – Ain Defla – site 2 – spore 2			Blé dur Waha
Ptr 16.7.3	El-Amra – Ain Defla – site 2 – spore 3			Blé dur Waha
Ptr 16.8.1	Ferme expérimentale ENSA – Alger – site 1 – spore 1			Blé dur Vitron
Ptr 16.8.2	Ferme expérimentale ENSA – Alger – site 1 – spore 2			Blé dur Vitron

Ptr 16.8.3	Ferme expérimentale ENSA – Alger – site 1 – spore 3		Blé dur Vitron
Ptr 16.9.1	Ferme expérimentale ENSA – Alger – site 2 – spore 1		Blé dur Vitron
Ptr 16.9.2	Ferme expérimentale ENSA – Alger – site 2 – spore 2		Blé dur Vitron
Ptr 16.9.3	Ferme expérimentale ENSA – Alger – site 2 – spore 3		Blé dur Vitron
Ptr 16.10.1	Station ENSA – Alger – spore 1		Blé dur Vitron
Ptr 16.10.2	Station ENSA – Alger – spore 2		Blé dur Vitron
Ptr 16.10.3	Station ENSA – Alger – spore 3		Blé dur Vitron
Ptr 16.11.1	Nord of Sétif – spore 1		Blé
Ptr 16.11.2	Nord of Sétif – spore 2		Blé
Ptr 16.11.3	Nord of Sétif – spore 3		Blé
Ptr 16.12.1	Nord of Sétif – spore 4		Blé
Ptr 16.12.2	Nord of Sétif – spore 5		Blé
Ptr 16.12.3	Nord of Sétif – spore 6		Blé
Ptr 16.13.1	Oued El-Alleug – Blida – site 1 – spore 1		Blé
Ptr 16.13.2	Oued El-Alleug – Blida – site 1 – spore 2		Blé
Ptr 16.13.3	Oued El-Alleug – Blida – site 1 – spore 3		Blé
Ptr 16.14.1	Oued El-Alleug – Blida – site 2 – spore 1		Blé dur Chen's
Ptr 16.14.2	Oued El-Alleug – Blida – site 2 – spore 2		Blé dur Chen's
Ptr 16.14.3	Oued El-Alleug – Blida – site 2 – spore 3		Blé dur Chen's
Ptr 16.15.1	Akbou – Béjaïa – site 1 – spore 1		Blé
Ptr 16.15.2	Akbou – Béjaïa – site 1 – spore 2		Blé
Ptr 16.15.3	Akbou – Béjaïa – site 1 – spore 3		Blé
Ptr 16.16.1	Médéa – site 2 – spore 1		Blé dur Vitron

Ptr 16.16.2	Médéa – site 2 – spore 2		Blé dur Vitron
Ptr 16.16.3	Médéa – site 2 – spore 3		Blé dur Vitron
Ptr 16.17.1	Oued Ghir – Béjaïa – site 1 – spore 1		Blé
Ptr 16.17.2	Oued Ghir – Béjaïa – site 1 – spore 2		Blé
Ptr 16.17.3	Oued Ghir – Béjaïa – site 1 – spore 3		Blé
Ptr 16.18.1	Oued Ghir – Béjaïa – site 2 – spore 1		Blé
Ptr 16.18.2	Oued Ghir – Béjaïa – site 2 – spore 2		Blé
Ptr 16.18.3	Oued Ghir – Béjaïa – site 2 – spore 3		Blé
Ptr 16.19.1	Oued Ghir – Béjaïa – site 3 – spore 1		Blé
Ptr 16.19.2	Oued Ghir – Béjaïa – site 3 – spore 2		Blé
Ptr 16.19.3	Oued Ghir – Béjaïa – site 3 – spore 3		Blé
Ptr 16.20.1	ITGC Oued Smar – Alger – site 1 – spore 1		Blé dur Vitron
Ptr 16.20.2	ITGC Oued Smar – Alger – site 1 – spore 2		Blé dur Vitron
Ptr 16.20.3	ITGC Oued Smar – Alger – site 1 – spore 3		Blé dur Vitron
Ptr 16.21.1	ITGC Oued Smar – Alger – site 2 – spore 1		Blé tendre Hiddab
Ptr 16.21.2	ITGC Oued Smar – Alger – site 2 – spore 2		Blé tendre Hiddab
Ptr 16.21.3	ITGC Oued Smar – Alger – site 2 – spore 3		Blé tendre Hiddab
Ptr 16.22.1	ITGC Oued Smar – Alger – site 3 – spore 1		Blé tendre Hiddab
Ptr 16.22.2	ITGC Oued Smar – Alger – site 3 – spore 2		Blé tendre Hiddab
Ptr 16.22.3	ITGC Oued Smar – Alger – site 3 – spore 3		Blé tendre Hiddab
Ptr 16.23.1	ITGC Oued Smar – Alger – site 4 – spore 1		Blé dur Vitron
Ptr 16.23.2	ITGC Oued Smar – Alger – site 4 – spore 2		Blé dur Vitron

Ptr 16.23.3	ITGC Oued Smar – Alger – site 4 – spore 3			Blé dur Vitron	
Ptr 16.24.1	ITGC Oued Smar – Alger – site 5 – spore 1			Blé	
Ptr 16.24.2	ITGC Oued Smar – Alger – site 5 – spore 2			Blé	
Ptr 16.24.3	ITGC Oued Smar – Alger – site 5 – spore 3			Blé	
Ptr 16.25.1	El-Khroub – Constantine – spore 1			Blé dur	
Ptr 16.25.2	El-Khroub – Constantine – spore 2			Blé dur	
Ptr 16.25.3	El-Khroub – Constantine – spore 3			Blé dur	
Ptr 16.25.4	El-Khroub – Constantine – spore 4			Blé dur	
Ptr TN 1.2	Tunisie			Tunisie	Blé
Ptr TN 1.5	Tunisie				Blé
Ptr TN 1.6	Tunisie				Blé
Ptr TN 1.9	Tunisie				Blé
Ptr TN 1.13	Tunisie				Blé
Ptr TN 2.1	Tunisie				Blé
Ptr TN 2.5	Tunisie	Blé			
Ptr TN 2.7	Tunisie	Blé			
Ptr TN 2.10	Tunisie	Blé			
Ptr TN 2.11	Tunisie	Blé			

**Annexe 2 : Lignées hybrides, variétés locales et populations de blé testées et leur origine.**

N°	Génotype	Espèce	Origine	Pedigree
<b>Lignées hybrides</b>				
1	BD 01 = Msbl-1/Quarmal	BD	ICARDA	ICD
2	BD 02 = Ter-2/3/HFN94-8/Mrb5//Zna-1	BD	Algérie / ICARDA	ICD00-1090-T- 2AP-AP-2AP-TR
3	BD 3 = Mgnl3/Aghrass2	BD	Algérie / ICARDA	ICD99-0015-C- 9AP-AP-21AP- AP



4	BD 5 = Mrf1/Stj2//Bcrch1	BD	Algérie / ICARDA	ICD99-0027-C- 0AP-14AP-AP- 9AP-AP
5	LD357E/2*TC60//JO69/3/FGO/4/GTA/ 5/SRN_1/6/TOTUS/7/ENTE/MEXI_2// HUI/4/YAV_1/3/LD357E/2*TC60//JO 69/8/SOMBRA_20/9/JUPARE C 2001/10/SOMAT_3 /PHAX_1//TILO_1 /LOTUS_4/11/SOOTY_9 /RASCON _37 //WODUCK/CHAM_3	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS04Y00755 T-0TOPB-12Y- 0M-06Y-1M-1Y- 0B
6	BCRIS/BICUM//LLARETA INIA/3/ DUKEM_12/ 2*RASCON_21/4/ SORA/2*PLATA_12//SOMAT_3/3/ AJAIA_12/F3LOCAL(SEL.ETHIO.13 5.85)//PLATA_13	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS07Y00142 S-099Y-099M- 10Y-01M-04Y- 0B
7	MINIMUS/COMB.DUCK_2//CHAM_ 3/3/RCOL*2/4/SOMAT_4/INTER_8	BD	Algérie / CIMMYT	
8	PLATA_7/ILBOR_1//SOMAT_3/3/CA BECA_2/PATKA_4//ZHONG ZUO/2*GREEN_3	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS04Y00053 S-13Y-0M-06Y- 4M-1Y-0B
9	ALTAR 84/STINT//SILVER_ 45/3/GUANAY /4/GREEN_14//YAV_10/AUK/10/CM H79.959/CHEN//SOOTY_9/RASCON _37/9/USDA595/3/D67.3/RABI//CRA/ 4/ALO/5/HUI/YAV_1/6/ARDENTE/7/ HUI/YAV79/8/POD_9/11/RCOL//SHA G_23/LAPDY_25/4/ARMENT//SRN_3 /NIGRIS_4/3/CANELO_9.1	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS06Y00816 T-0TOPB-61Y- 0M-8Y-1M-0Y
10	MINIMUS_6/PLATA_16//IMMER/3/S OOTY_9/RASCON_37/10/PLATA_10 /6/MQUE/4/USDA573//QFN/AA_7/3/ ALBA-D/5/AVO/HUI/7/ PLATA_13/8/ THKNEE_11/9/ CHEN/ALTAR 84 /3/ HUI/POC//BUB/RUFO/4/ FNFOOT/11/ ECO/CMH76A.722//BIT/3/ALTAR 84/4/ AJAIA_2/5/KJOVE_1/6/MALMUK_1/ SERRATOR_1	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS07Y00032 S-099Y-099M- 16Y-2M-04Y-0B
11	SILK_3/DIPPER_6/3/ACO89/DUKEM _4//5*ACO89/4/PLATA_7/ILBOR_1//	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS07Y00046 S-099Y-099M-

	SOMAT_3/5/LLARETA INIA/ YEBAS_8 /3/MINIMUS_6/ PLATA_16 //IMMER/4/D86135/ACO89 //PORRON_4/3/SNITAN			18Y-2M-04Y-0B
12	SOOTY_9/RASCON_37//JUPARE C 2001/3/SOOTY_9 /RASCON_37//SOMAT_3.1	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS06B00183 S-099Y-099M- 5Y-2M-04Y-0B
13	SORA/2*PLATA_12//SOMAT_3/6/C HEN_1/TEZ/3/GUIL//CIT71/CII/4/SO RA/PLATA_12/5/STOT//ALTAR 84/ALD /7/ TECA96/TILO_1 /8/GUAYACAN INIA//YUAN_1/ GREEN_18/3/ SOOTY_9/RASCON_37/5/DUKEM_1 5 /3/BISU_1/PLATA_16//RISSA/4/SOO TY_9/RASCON_37	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS06B00304 S-099Y-099M- 16Y-2M-04Y-0B
14	SOOTY_9/RASCON_37//JUPARE C 2001/3/ SOOTY_9/RASCON_37//GUAYACA N INIA	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS06B00182 S-099Y-099M- 19Y-2M-04Y-0B
15	SOOTY_9/RASCON_37//SOMAT_3.1 /3/SOOTY_9/RASCON_37//STORLO M/4/SOOTY_9/RASCON_37//GUAY ACAN NIA/3/SOOTY_9/RASCON _37// LLARETA INIA	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS07Y00802 D-099Y-099M- 2Y-4M-04Y-0B
16	PLATA_7/ILBOR_1//SOMAT_3/3/SO RA/2*PLATA_12//SRN_3/NIGRIS_4/ 4/BCRIS/BICUM//LLARETA INIA/3/ DUKEM_12/2*RASCON_21	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS07Y00032 S-099Y-099M- 16Y-2M-04Y-0B
17	SILK_3/DIPPER_6/3/ACO89/DUKEM _4//5*ACO89/4/PLATA_7/ILBOR_1// SOMAT_3/5/LLARETA INIA/YEBAS_8 /3/MINIMUS_6/PLATA_16//IMMER/ 4/D86135/ACO89//PORRON_4/3/SNI TAN	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS07Y00046 S-099Y-099M- 18Y-2M-04Y-0B
18	SOOTY_9/RASCON_37//SOMAT_3.1 /3/SOOTY_9/RASCON_37//STORLO M/4/SOOTY_9/RASCON_37//GUAY ACAN INIA/3/SOOTY_9/RASCON_37//LLA RETA INIA	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS07Y00802 D-099Y-099M- 2Y-4M-04Y-0B

19	SIMETO/3/SORA/2*PLATA_12//SRN_3/NIGRIS_4/5/TOSKA_26/RASCON_37//SNITAN/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS06B00488 T-099Y-099M- 11Y-0M-04Y-0B
20	PH896-21/5/HUBEI//SOOTY_9/ RASCON_37/3/ 2*SOOTY_9/RASCON_37/4/SOOTY_9/ RASCON_37/6/1A.1D 5+1- 06/3*MOJO//RCOL/4/ARMENT// SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS07Y00459 T-099Y-099M- 18Y-3M-04Y-0B
21	ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/4/TOSKA_26/RASCON_37//SNITAN/5/PLAYERO	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS04B00362 T-0TOPY-16Y- 0M-1Y-0M-2Y- 0B
22	ADAMAR_15//ALBIA_1/ALTAR_84/3/SNITAN/4/SOMAT_4/INTER_8/5/SOOTY_9/RASCON_37/6/BICHENA/AKAKI_7/4/LIS_8/FILLO_6/3/FUUT//HORA/JOR/5/YAZI_1/AKAKI_4//SOMAT_3/3/AUK/GUIL//GREEN/7/TOPDY_18/FOCHA_1//ALTAR84/3/AJAIA_12/F3LOCAL AL (SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13/4/SO	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS11Y00230 S-099Y-040M- 22Y-0M-06Y-0B
23	GODRIN/GUTROS//DUKEM/3/THKNEE_11/4/DUKEM_1//PATKA_7/YAZI_1/3/PATKA_7/YAZI_1/5/AJAIA_12/F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13/3/ADAMAR	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS04B00367 T-0TOPY-10Y- 0M-4Y-0M-4Y- 0B
24	AJAIA_12/F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13/3/SOMBRA_20/4/SNITAN/5/SOMAT_4/INTER_8/10/ADAMAR_15//ALBIA_1/ALTAR_84/3/SNITAN/9/USDA595/3/D67.3/RABI//CRA/4/ALO/5/HUI/YAV_1/6/ARDENTE/7/HUI/YAV79/8/POD_9	BD	Algérie / CIMMYT	CDSS06Y00390 S-41Y-0M-1Y- 1M-0Y
25	BICHENA/AKAKI_7/4/LIS_8/FILLO_6/3/FUUT//HORA/JOR/5/YAZI_1/AKAKI_4//SOMAT_3/3/AUK/GUIL//GREEN/6/RASCON_33/TISOMA_2/3/CANELO_8//SORA/2*PLATA_12/4/SOMAT_4/INTER_8	BD	Algérie / CIMMYT	

Variétés locales				
26	T. POLONICUM x Z. Bouteille	BD	Algérie	Sélection dans les populations locales
27	MOHAMED BEN BACHIR	BD	Algérie	Sélection dans les populations locales
28	MONTPELLIER	BD	Algérie	Sélection dans les populations locales
29	HEDBA-03	BD	Algérie	Polonicum x ZB
30	BIDI 17	BD	Algérie	Sélection dans les populations locales
31	OUED ZENATI368	BD	Algérie	Sélection dans les populations locales
32	USDA 7317	BD	Algérie	Sélection dans les populations locales
33	DJENNAH-KHETIFA	BD	Tunisie/ Algérie	Ancienne population locale
34	GUEMGOUM RKHEM	BD	Algérie	Ancienne population locale
35	GLOIRE DE MONT GOLFIER	BD	Algérie	Sélection dans les populations locales
36	BELIOUNI	BD	Algérie	Sélection dans les populations locales
37	Senatore-capelli	BD	Italie	Variété italienne
38	Adjini	BD	Algérie	Variété locale
39	Longlois	BD	Algérie	Variété locale
40	A 06 : AANI AMELAL	BT	Adrar (Algérie)	Population
41	A 11 : BEL MABROUK	BT	Adrar (Algérie)	Population
42	A 13 : BEL MABROUK	BT	Adrar (Algérie)	Population
43	A 15 : BEL MABOUK	BT	Adrar (Algérie)	Population

44	A 16 : BEL MABROUK	BT	Adrar (Algérie)	Population
45	A 19 : BEL MABROUK et OUM M'RAKBA	BT	Adrar (Algérie)	Population
46	A 22 : CH'GUIRA	BT	Adrar (Algérie)	Population
47	A 24 : CHOUITAR	BT	Adrar (Algérie)	Population
48	A 26 : ELFARH	BT	Adrar (Algérie)	Population
49	A 32 : FARINA	BT	Adrar (Algérie)	Population
50	A 33 : FARINA	BT	Adrar (Algérie)	Population
51	A 35 : HAMRA	BT	Adrar (Algérie)	Population
52	A 36 : HAMRA	BT	Adrar (Algérie)	Population
53	A 37 : HAMRA TOUATIA et BEL MABROUK	BT	Adrar (Algérie)	Population
54	A 40 : LAHMIRA	BT	Adrar (Algérie)	Population
55	A 45 : OUM M'RAKBA	BT	Adrar (Algérie)	Population
56	A 46 : OUM M'RAKBA	BT	Adrar (Algérie)	Population
57	A 50 : GUEMH	BT	Adrar (Algérie)	Population
58	A 51 : GUEMH	BT	Adrar (Algérie)	Population
59	A 52 : SEBAGA	BT	Adrar (Algérie)	Population
60	A 54 : TAZI	BT	Adrar (Algérie)	Population
61	A 56 : TAZI	BD	Adrar (Algérie)	Population
62	A 57 : TAZI	BD	Adrar (Algérie)	Population
63	A 58 : TAZI	BD	Adrar (Algérie)	Population
64	A 60 : TAZI	BD	Adrar (Algérie)	Population
65	A 64 : HAMRA	BT	Adrar (Algérie)	Population
66	A 65 ??			
67	A 66 : MOUMNA	BT	Adrar (Algérie)	Population
68	A 67 : CHATER	BT	Adrar (Algérie)	Population
69	A 68 : HAMRA	BT	Adrar (Algérie)	Population
70	T 14 : BOURBAA	BT	Tamanrasset (Algérie)	Population
71	T 15 : BOURBAA/BAIDA LAKHFIFA	BT	Tamanrasset (Algérie)	Population

72	T 17 : CHOUITAR	BT	Tamanrasset (Algérie)	Population
73	T 28 : A 28 : EL HAMRA	BT	Adrar (Algérie)	Population
74	T 35 : MANGA	BT	Tamanrasset (Algérie)	Population
75	T 36 : MANGA	BT	Tamanrasset (Algérie)	Population
76	T 40 : MANGA	BT	Tamanrasset (Algérie)	Population
77	T 41 : A 41 : MANGA	BT	Adrar (Algérie)	Population
78	T 47 : MANGA	BT	Tamanrasset (Algérie)	Population
79	T 53 : GUEMH	BT	Tamanrasset (Algérie)	Population
<b>Cultivars</b>				
80	Achouri = Mrf1/Stj2//Gdr2/Mgn1	BD	ICARDA/ Algérie	CDSS05B00021 S-52Y-0M-4Y- 2M-0Y
81	Icarasha*2 = Stj3//Bcr/lks4/3/Ter-3	BD	ICARDA/ Algérie	
82	CIRTA = Hedba3/GDO VZ 619	BD	ITGC (Algérie)	
83	BENI MESTINA = Lahn/Ch1.2003	BD	ICARDA/ Algérie	ICD92-DNA111
84	WAHBI = Waha/*2Bidi17	BD	Algérie	
85	SIGUS = Ter-1/3/Stj3//Bcr/Lks4	BD	ICARDA/ Algérie	ICD1036-T-0AP- 9AP-AP-5AP-AP
86	BOUSSELLAM = Heider/Marte//Huevos de Oro	BD	Algérie /ICARDA	ICD86-0414- ABL-OTR-4AP- OTR-14AP-OTR
87	WAHA= Plc'S'/Ruff//Gta''S''/3/Rolette	BD	Algérie / CIMMYT	CM17904-3M- 1Y-1M-0Y'
88	AÏN LEHMA=Beltagy''3''	BD	ICARDA/ Algérie	ICD97-0396-T- 1AP-AP-5AP- 0AP-16AP-AP
89	SIMETO = Capeiti x Valvona	BD	IEC (Italie)	
90	Ofonto	BD	IEC (Italie)	Adamello x Appulo

91	Targui = Ammar-6	BD	CIMMYT/ Algérie	ICD94-0918-C- 12AP-0AP-6AP- 0AP-3AP-0AP
92	MEXICALI (ACSAD 65)	BD	CIMMYT	
93	CHEN 'S'	BD	CIMMYT	CD 26406-3B- 2Y-9Y-OM-3Y- OB
94	CAPEITI 8	BD	Italie	
95	JORI C69	BD	CIMMYT	
96	HOGGAR = JO''S''/AA''S''//fg''S''= (VITRON)	BD	Algérie / CIMMYT	CM 9799
97	Beni Mestina = Lahn/Ch1.2003	BD	Algérie	ICD92-DNA111
98	SIGUS = Ter-1/3/Stj3//Bcr/Lks4	BD	ICARDA/ Algérie	ICD1036-T-0AP- 9AP-AP-5AP-AP
99	TELL 76	BD	Algérie	
100	GDO VZ 469/Jo''S''X 61.130- Lds=Stk''S''= TASSILI =RABI/FG	BD	CYMMIT (Mexique)	CM 470-1M-3Y- 0KB
101	INRAT 69	BD	Tunisie	
102	Wahbi = BIDI 17 / WAHA // BIDI 17	BD	Algérie	
103	CIRTA = HEDBA-03 / GDO VZ 619	BD	Algérie	
104	COCORIT C71	BD	CYMMIT (Mexique)	
105	SAHEL	BD	Algérie	
106	ZB / FG	BD	Algérie	
107	Beltagy-3	BD	ICARDA	ICD97-0396-T- 1AP-AP-5AP- 0AP-16AP-AP
108	Tell	BD	Algérie	
109	INRAT 69	BD	Tunisie	
110	Haurani	BD	Jordanie	Jordanian landrace
111	<i>Triticum turgidum</i>	BD	ICARDA	Wild Relative
112	<i>Triticum dicoccum</i>	BD	ICARDA	Wild Relative
113	Setifis= Ofanto/Bousselam	BD	Algérie	

114	Miki 3	BD	Algérie	ICD94-0994-C-10AP-0AP-2AP-0AP-9AP-0TR
115	Megress= Ofanto/Waha//MBB	BD	Algérie	
116	Tajdid = Ofanto/Bousselam's	BD	Algérie	

### **Annexe 3 : Composition du jus V8.**

L'huile d'olive :	1 cuillère à soupe
Tomate :	5 (grandes)
Oignon :	1/2
Ail :	2 gousses
Betterave :	1
Carotte :	1
Concombre :	2 petits
Persil :	1/4 de verre (haché)
Miel :	1 cuillère à soupe

### **Annexe 4 : Composition du milieu V8-PDA.**

Jus V8 :	150 ml
Pomme de terre :	200 g
Agar :	20 g
CaCO <sub>3</sub> :	3 g
Eau distillée :	complétée jusqu'à 1000 ml

### **Annexe 5 : Composition du milieu PDA.**

Pomme de terre :	200 g
Glucose :	20 g
Agar :	20 g
Eau distillée :	complétée jusqu'à 1000 ml



### **Annexe 6 : Composition du milieu liquide PDB.**

Pomme de terre :	200 g
Glucose :	20 g
Eau distillée :	complétée jusqu'à 1000 ml

### **Annexe 7 : Solutions d'extraction d'ADN.**

#### **Annexe 7.1 : Solution EDTA (Stock).**

EDTA (0,5 M, pH : 8) :	18,61 g
Eau distillée :	complétée jusqu'à 100 ml

#### **Annexe 7.2 : Solution de lyse (Tris-base 50 mM, EDTA 50 mM, 1 % SDS, Protéinase K).**

Tris-base (50 mM) :	0,6057 g
EDTA (0,5 M, pH : 8) :	10 ml
SDS (1 %) :	1 g
Protéinase K (200 µg/ml) :	2 ml
Eau distillée :	complétée jusqu'à 100 ml

#### **Annexe 7.3 : Solution de précipitation.**

Acétate de sodium (3 M) :	24,609 g
Eau distillée :	complétée jusqu'à 100 ml

#### **Annexe 7.3 : Tampon TE (Tris-base 10 mM, EDTA 1 mM, pH : 8).**

Tris-base :	0,06 g
EDTA (0,5 M, pH : 8) :	0,1 ml
Eau distillée :	complétée jusqu'à 50 ml

#### **Annexe 7.3 : Tampon TAE (50X) (Tris-base 2M, Acide Acétique 1M, EDTA 0,05M, pH : 8)**

Tris-base :	121 g
Acide acétique (1 M) :	28,55 ml
EDTA (0,5 M, pH : 8) :	50 ml
Eau distillée :	complétée jusqu'à 500 ml

#### Annexe 7.4 : Solution de rinçage.

Ethanol : 70 %

#### Annexe 8 : Les amorces utilisées et leurs séquences respectives.

Marqueur	Amorce	Séquence
<b>ITS</b>	ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS 2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
	ITS 3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
	ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
	ITS 5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
	ITS 15	TCCTCCGCTTATTGATATG
<b>ISSR</b>	807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
	810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
	834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
	835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
	841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC
	857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG
	HB 9 N 31	GTGTGTGTGTGTGG
HB 12 N 31	CAC CACCAC GC	
HB 14 N 31	CTC CTCCTC GC	
<b>RAPD</b>	OPI-01	ACCTGGACAC
	OPI-06	GGAATTCGG
	OPF-12	ACGGTACCAG
	OPF-16	GGAGTACTGG

## Annexe 9 : Les enzymes de restriction et leurs sites de reconnaissance successifs.

Enzyme	Site de reconnaissance
<i>EcoRI</i>	G"AATTC
<i>PstI</i>	CTGCA"G
<i>HpaII</i>	C"CGG
<i>XbaI</i>	T"CTAGA

## Annexe 10 : Composants du gel de polyacrylamide.

### Annexe 10.1 : Solution d'acrylamide 30% (stock)

Acrylamide en poudre :	290 g
Bisacrylamide en poudre	10 g
Eau distillée :	Complétée jusqu'à 1000 ml
Filtration et conservation à l'obscurité à 4°C.	

### Annexe 10.2 : Tampon TBE (10X stock)

Tris-base :	108 g
Acide borique :	55 g
EDTA (0.5 M, pH : 8) :	40 ml
Eau distillée :	Complétée jusqu'à 1000 ml

### Annexe 10.3 : APS (Ammonium PerSulfate) 10 %

Ammonium Persulfate :	0,2 g
Eau distillée :	2 ml

Le mélange est préparé dans un tube, après que le mélange soit bien dissout par un passage au vortex, il est conservé à 4°C.

**Annexe 11 : Origine et codes des isolats utilisés, rayon de la croissance mycélienne journalière (mm) pour les 6 jours de croissance et diamètre total des colonies au 6<sup>ème</sup> jour de mesure (mm).**

<b>Wilayas</b>	<b>Isolat</b>	<b>Rayon de croissance 1<sup>er</sup> jour (mm)</b>	<b>Rayon de croissance 2<sup>ème</sup> jour (mm)</b>	<b>Rayon de croissance 3<sup>ème</sup> jour (mm)</b>	<b>Rayon de croissance 4<sup>ème</sup> jour (mm)</b>	<b>Rayon de croissance 5<sup>ème</sup> jour (mm)</b>	<b>Rayon de croissance 6<sup>ème</sup> jour (mm)</b>	<b>Diamètre total des colonies au 6<sup>ème</sup> jour (mm)</b>
Béjaïa	Ptr 16.1.1	6,83	7,5	6,67	6,5	6	3,67	84
Béjaïa	Ptr 16.1.2	6,17	8,17	6,5	6,5	7	1,33	84
Béjaïa	Ptr 16.1.3	7	8	8	7,33	4,33	3	84
Béjaïa	Ptr 16.2.1	6,5	7,5	7,33	6,83	6	3	84
Béjaïa	Ptr 16.2.2	6,5	8	6,83	7,33	5	2,67	84
Béjaïa	Ptr 16.2.3	6,5	8,17	6,83	6,67	5,5	3,67	84
Béjaïa	Ptr 16.3.1	6	6,33	7,17	6,5	7	4	84
Béjaïa	Ptr 16.3.2	4,67	6,83	7,67	8	4	5,33	83,33
Béjaïa	Ptr 16.3.3	7	6,17	8	5,67	6	5	84
Béjaïa	Ptr 16.4.2	6,67	7	6,83	6,17	5,83	4,33	84
Béjaïa	Ptr 16.4.3	5,5	6,5	7,33	7,17	5,17	5,5	84
Béjaïa	Ptr 16.5.1	6,83	8	7,33	7	5,83	1,83	84
Béjaïa	Ptr 16.5.2	4,67	6	6,83	6,5	5,67	6,5	76,33
Béjaïa	Ptr 16.5.3	4,5	7	7,33	6,67	5,33	5,5	77,67
Ain Defla	Ptr 16.6.1	6,33	7,5	6,5	6,33	5,17	4,83	83,33
Ain Defla	Ptr 16.6.2	6,17	7,67	7,33	6,83	4,67	4,83	84
Ain Defla	Ptr 16.6.3	5,83	5,5	6,83	7	4,67	4	80
Ain Defla	Ptr 16.7.1	7,83	6,33	7	6,67	5,83	3,83	84
Ain Defla	Ptr 16.7.2	6	5,33	6,83	6,83	5,5	4,5	74,67
Ain Defla	Ptr 16.7.3	6,33	6,83	7	6,83	5,17	4,5	80,67

Alger	Ptr 16.8.1	6,33	7,33	7,33	7	4,5	5,17	81,33
Alger	Ptr 16.8.2	3,83	8	4,83	4,83	7	5,33	71,33
Alger	Ptr 16.8.3	5,83	8,5	6,83	6,33	5,17	3	76
Alger	Ptr 16.9.1	5,17	5,83	5,17	5	6,67	4,5	70,33
Alger	Ptr 16.9.2	4,83	7,5	6,5	5,67	6,5	4	73,33
Alger	Ptr 16.9.3	6,17	8,17	6,5	6,5	6,33	3,5	80
Alger	Ptr 16.10.1	8	7,33	6,5	6	5,83	3,83	80
Alger	Ptr 16.10.2	5,83	5,17	6,17	5,5	5,5	4,83	72
Alger	Ptr 16.10.3	5,17	5,83	7,67	6,5	5,83	6,17	80,33
Sétif	Ptr 16.11.1	5,67	5,67	7	6,5	3,5	4	70,33
Sétif	Ptr 16.11.2	4,33	4,83	2,83	3	4,33	2,67	49,33
Sétif	Ptr 16.11.3	5,5	6,67	7,33	7	6,33	4,67	84
Sétif	Ptr 16.12.1	3,5	5,33	6,33	6	6,33	5,67	70
Sétif	Ptr 16.12.2	3,5	5,33	6,33	6	6,33	3,33	78
Sétif	Ptr 16.12.3	7,5	6,33	7,67	7,33	4,33	2,83	82
Blida	Ptr 16.13.1	4,33	6	6,83	6,5	5,5	4,5	70
Blida	Ptr 16.13.2	5,33	5,33	6,83	6,5	4,5	7,83	76,67
Blida	Ptr 16.13.3	7	6,33	7	6,83	5,83	4,67	84
Blida	Ptr 16.14.1	6,5	7	6,67	6,67	4,67	6	84
Blida	Ptr 16.14.2	6	5,17	5,17	5,33	4	4	65,67
Blida	Ptr 16.14.3	5	7,67	6,67	6,33	5	5,33	79,33
Béjaïa	Ptr 16.15.1	4,5	6,5	5,83	6,67	5,17	5,67	70,67
Béjaïa	Ptr 16.15.2	6,5	7,17	7,5	6,5	5,5	4	84
Béjaïa	Ptr 16.15.3	5,67	6	7,67	6,17	5,17	6,17	78,33
Médéa	Ptr 16.16.1	6,33	5,5	7,83	7,17	4,67	5,17	77,67
Médéa	Ptr 16.16.2	6,17	6,17	7,5	6,5	5,5	6	84
Médéa	Ptr 16.16.3	5,67	5,33	6,83	7	5,67	6,33	78
Béjaïa	Ptr 16.17.1	5,17	6	6,83	7	5	6,67	77,33

Béjaïa	Ptr 16.17.2	6,5	5,83	6	6,5	4,33	2,33	67,33
Béjaïa	Ptr 16.17.3	5,67	4,17	4	4	3,83	1,33	48,67
Béjaïa	Ptr 16.18.1	7,33	8,17	8,33	2,83	7,17	3,33	82
Béjaïa	Ptr 16.18.2	7,17	7,33	7	7,17	3,67	2,5	77,33
Béjaïa	Ptr 16.18.3	4,33	7	6,67	6,83	6,17	6,83	82,67
Béjaïa	Ptr 16.19.1	7,83	6,5	8	7,83	5,33	1,5	84
Béjaïa	Ptr 16.19.2	5	6,5	6,67	6,83	6,5	6,5	84
Béjaïa	Ptr 16.19.3	5,5	7,5	6,33	6,83	6	6	84
Alger	Ptr 16.20.1	6,5	9,5	6	5,17	6,5	4,67	84
Alger	Ptr 16.20.2	6,5	6,33	7,17	7	4,83	5,33	79,33
Alger	Ptr 16.20.3	6,67	6,17	7,33	7,17	5,83	4,83	84
Alger	Ptr 16.21.1	4,83	4,5	5,33	5	4,5	4,67	60,67
Alger	Ptr 16.21.2	6,67	5,17	7,5	7	4	5,67	76,67
Alger	Ptr 16.21.3	5,83	5,5	7	6,33	5,67	5,67	77
Alger	Ptr 16.22.1	3,33	4,5	5,33	5,33	3,33	4,5	55,33
Alger	Ptr 16.22.2	4	5,83	5	4,83	7,83	2,67	53,33
Alger	Ptr 16.22.3	5	6,33	7,33	7,17	5,17	5,67	77,33
Alger	Ptr 16.23.1	5,67	8,83	7,17	6,67	4,67	4,33	81,33
Alger	Ptr 16.23.2	5,33	5,67	6,17	5,5	4,67	7,17	71,67
Alger	Ptr 16.23.3	5	7,33	7	6,5	4,83	6,67	81,33
Alger	Ptr 16.24.1	5,33	5,83	7	7	5,5	5,67	76,33
Alger	Ptr 16.24.2	6,5	7,5	7	7,67	3,67	3,67	74,67
Alger	Ptr 16.24.3	4,67	5,83	7,67	7,67	5,33	7	84
Constantine	Ptr 16.25.1	5,67	7,5	6,33	6,5	5,5	5,17	78
Constantine	Ptr 16.25.2	4,83	6	5	4,33	3,5	4,17	62
Constantine	Ptr 16.25.3	5,67	7,83	6,17	5,83	9,67	3,33	84
Constantine	Ptr 16.25.4	7,5	7,5	8,17	6,33	6,17	2,17	84
Alger	I2.4	4,17	5,17	5,83	5,67	4,5	5,5	64
Alger	I2.16	5,33	7,17	7,33	6,5	5,5	5,83	79
Alger	I2.21	5,67	7	6,17	6,83	6	6	78

Blida	17.8	4,83	6,5	6,67	7	4	3,67	69,33
Blida	5.3	4,17	4	5	5,17	3,83	3,5	53,67
Blida	5.11	5,67	6,83	7,33	6,67	6,33	7,33	84
Blida	7.9	5,83	7	6,67	6,83	4,33	5,83	78
Alger	13.13	6,67	7,33	6,83	7,5	5,33	6,17	82,67
Blida	16.2	3	4	5	5,17	4,17	5,33	56,67
Blida	16.5	4,83	4,5	5,67	5,17	4,83	4,5	61,67
Blida	16.7	4,33	5,17	4,83	4,5	5,33	6,17	64
Alger	90.2	4	6	4,83	4,33	2,67	3,67	56,67
Tunisie	TN 1.6	5,17	4,5	6,67	4,67	4,17	5,33	67,33
Tunisie	TN 2.1	6,5	7,67	6	6,17	6	7,17	84
Tunisie	TN 2.5	6	8,33	6,67	5,33	6,83	6,67	84
Tunisie	TN 2.7	5,67	4,92	4,75	6,83	4,5	5,5	69,67
Tunisie	TN 2.10	5,67	7	5,67	5	5	5,5	71,67
Tunisie	TN 2.11	5,33	5,67	6,17	5,5	4,67	7,17	71,67

**Annexe 12 : Analyse de la variance pour l'effet de la température sur la croissance mycélienne des isolats de *P. tritici-repentis*.**

**Annexe 12.1 : Croissance mycélienne (totale) :** Comparaison entre les diamètres de croissance mycélienne totale des isolats par l'analyse statistique réalisée à travers le test de Kruskal-Wallis (alternative non paramétrique de l'ANOVA).

**Récapitulatif du test Kruskal-Wallis pour échantillons indépendants**

N total	279
Statistiques de test	243,127 <sup>a</sup>
Degré de liberté	92
Sig. asymptotique (test bilatéral)	,000

a. Les statistiques de test sont réglées pour les ex aequo.

### Récapitulatif du test d'hypothèse

	Hypothèse nulle	Test	Sig.	Décision
1	La distribution de croissance totale est la même sur les catégories de isolats.	Test Kruskal-Wallis pour échantillons indépendants	,000	Rejeter les hypothèses nulles.

Les significations asymptotiques sont affichées. Le niveau de signification est de ,050.

**Annexe 12.2 : Croissance mycélienne (jours) :** Comparaison entre les diamètres de croissance mycélienne des isolats (du 1<sup>er</sup> au 6<sup>ème</sup> jour) par l'analyse statistique réalisée à travers le test de Kruskal-Wallis (alternative non paramétrique de l'ANOVA).

#### Tests statistiques <sup>a, b</sup>

	1eme jour	2eme jour	3eme jour	4eme jour	5eme jour	6eme jour	croissance totale
Khi-deux	224,364	236,743	204,967	189,158	183,393	209,226	243,127
Ddl	92	92	92	92	92	92	92
Sig. asymptotique	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000

a. Test de Kruskal Wallis

b. Variable de regroupement : isolats

**Annexe 13 : Analyse de la variance pour le pouvoir de la sporulation des isolats de *P. tritici-repentis*.**

**Annexe 13.1 :** Comparaison entre les isolats par l'analyse statistique réalisée à travers le test de Kruskal-Wallis (alternative non paramétrique de l'ANOVA)

#### Récapitulatif du test Kruskal-Wallis pour échantillons indépendants

N total	279
Statistiques de test	234,642 <sup>a</sup>
Degré de liberté	92
Sig. asymptotique (test bilatéral)	,000

a. Les statistiques de test sont réglées pour les ex aequo.



### Récapitulatif du test d'hypothèse

	Hypothèse nulle	Test	Sig.	Décision
1	La distribution de Nombre de Spores/mm <sup>2</sup> est la même sur les catégories de isolats.	Test Kruskal-Wallis pour échantillons indépendants	,000	Rejeter les hypothèses nulles.

Les significations asymptotiques sont affichées. Le niveau de signification est de ,050.

### Annexe 14 : Résultats de corrélations non paramétriques (Test Rho de Spearman)

#### Corrélations

		moyenne de la croissance mycélienne (mm)	moyenne du pouvoir de sporulation (spores/ml/mm <sup>2</sup> )
Rho de Spearman	moyenne de la croissance mycélienne (mm)	Coefficient de corrélation	1,000
		Sig. (bilatéral)	-,125*
		N	,037
			279
	moyenne du pouvoir de sporulation (spores/ml/mm <sup>2</sup> )	Coefficient de corrélation	-,125*
		Sig. (bilatéral)	1,000
		N	,037
			279

\*. La corrélation est significative au niveau 0,05 (bilatéral).





**Annexe 17 :** Réaction de 116 géotypes de blé (25 lignées hybrides, 54 variétés et 37 cultivars) à l'égard des deux races 1 et 5 de *Pyrenophora tritici-repentis* sous conditions contrôlées.

Géotype	Race 1 (Pti2)		Race 5 (DW7)	
	Type de lésion	Réaction	Type de lésion	Réaction
<b>Lignées hybrides</b>				
1	4	Modérément Sensible	5	Sensible
2	4	Modérément Sensible	5	Sensible
3	4	Modérément Sensible	1	Résistant
4	1	Résistant	5	Sensible
5	4	Modérément Sensible	5	Sensible
6	5	Sensible	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible
7	4	Modérément Sensible	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible
8	4	Modérément Sensible	5	Sensible
9	5	Sensible	1	Sensible
10	5	Sensible	5	Sensible
11	5	Sensible	4	Sensible
12	5	Sensible	5	Sensible
13	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
14	4	Modérément Sensible	5	Sensible
15	4	Modérément Sensible	5	Sensible
16	5	Sensible	4	Modérément Sensible
17	4	Modérément Sensible	1	Résistant
18	4	Modérément Sensible	2	Modérément Résistant
19	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible

20	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
21	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
22	5	Sensible	5	Sensible
23	5	Sensible	5	Sensible
24	4	Modérément Sensible	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible
25	4	Modérément Sensible	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible
<b>Variétés locales</b>				
26	1	Résistant	2	Modérément résistant
27	4	Modérément Sensible	5	Sensible
28	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
29	5	Sensible	4	Modérément Sensible
30	5	Sensible	4	Modérément Sensible
31	4	Modérément Sensible	2	Modérément Résistant
32	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
33	4	Modérément Sensible	5	Sensible
34	5	Sensible	4	Modérément Sensible
35	5	Sensible	5	Sensible
36	5	Sensible	1	Résistant
37	2	Modérément Résistant	5	Sensible
38	5	Sensible	1	Résistant
39	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
40	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
41	4	Modérément Sensible	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible

42	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
43	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
44	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
45	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
46	4	Modérément Sensible	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible
47	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
48	4	Modérément Sensible	5	Sensible
49	5	Sensible	4	Modérément Sensible
50	4	Modérément Sensible	5	Sensible
51	5	Sensible	5	Sensible
52	4	Modérément Sensible	5	Sensible
53	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
54	4	Modérément Sensible	5	Sensible
55	5	Sensible	5	Sensible
56	4	Modérément Sensible	5	Sensible
57	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible
58	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible
59	5	Sensible	5	Sensible
60	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible	1	Résistant
61	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
62	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
63	3	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
64	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible

65	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
66	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
67	4	Modérément Sensible	5	Sensible
68	5	Sensible	5	Sensible
69	5	Sensible	4	Modérément Sensible
70	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
71	4	Modérément Sensible	5	Sensible
72	5	Sensible	4	Modérément Sensible
73	5	Sensible	4	Modérément Sensible
74	4	Modérément Sensible	5	Sensible
75	5	Sensible	4	Modérément Sensible
76	5	Sensible	5	Sensible
77	5	Sensible	4	Modérément Sensible
78	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
79	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
<b>Cultivars</b>				
80	4	Modérément Sensible	5	Sensible
81	4	Modérément Sensible	4	Modérément Résistant
82	5	Sensible	1	Résistant
83	4	Modérément Sensible	5	Sensible
84	4	Modérément Sensible	5	Sensible
85	4	Modérément Sensible	1	Résistant
86	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
87	4	Modérément Sensible	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible
88	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible	5	Sensible

89	5	Sensible	1	Résistant
90	4	Modérément Sensible	2	Modérément Résistant
91	5	Sensible	4	Modérément Sensible
92	4	Modérément Sensible	4	Modérément Sensible
93	5	Sensible	4	Modérément Sensible
94	5	Sensible	2	Modérément Résistant
95	4	Modérément Sensible	5	Sensible
96	5	Sensible	2	Modérément Résistant
97	5	Sensible	4	Modérément Sensible
98	1	Résistant	1	Résistant
99	1	Résistant	1	Résistant
100	4	Modérément Sensible	2	Modérément Résistant
101	5	Sensible	4	Modérément Sensible
102	5	Sensible	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible
103	1	Résistant	1	Résistant
104	5	Sensible	5	Sensible
105	4	Modérément Sensible	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible
106	2	Modérément Résistant	4	Modérément Sensible
107	2	Modérément Résistant	2	Modérément Résistant
108	5	Sensible	1	Résistant
109	2	Modérément Résistant	5	Sensible
110	4	Modérément Sensible	5	Sensible
111	1	Résistant	5	Sensible
112	2	Modérément Résistant	5	Sensible
113	2	Modérément Résistant	1	Résistant
114	1	Résistant	1	Résistant
115	5	Sensible	5	Sensible
116	3	Modérément Résistant/ Modérément Sensible	5	Sensible



**Annexe 18 :** Analyse de la variance pour la réaction des différents génotypes à l'égard des deux races 1 et 5 de *P. tritici-repentis* par le test non paramétrique Kruskal-Wallis.

	<b>Réaction Race 1</b>	<b>Réaction Race 5</b>
<b>Khi-deux</b>	334,042	347,000
<b>Ddl</b>	115	115
<b>Sig. asymptotique</b>	,000	,000

**Annexe 19 :** Analyse de la variance pour la réaction des 6 génotypes résistants à l'égard de la race 1 de *P. tritici-repentis* par le test non paramétrique Kruskal-Wallis.

	<b>30 Mars 219</b>	<b>10 Avril 2019</b>	<b>20 Avril 2019</b>	<b>01 Mai 2019</b>
<b>Khi-deux</b>	,000	,000	6,800	11,333
<b>Ddl</b>	5	5	5	5
<b>Sig. asymptotique</b>	1,000	1,000	,236	,057

**Annexe 20 :** Analyse de la variance pour la réaction des 11 génotypes résistants à l'égard de la race 5 de *P. tritici-repentis* par le test non paramétrique Kruskal-Wallis.

	<b>30 Mars 2019</b>	<b>10 Avril 2019</b>	<b>20 Avril 2019</b>	<b>01 Mai 2019</b>
<b>Khi-deux</b>	,000	,000	12,366	15,019
<b>Ddl</b>	10	10	10	10
<b>Sig. asymptotique</b>	1,000	1,000	,261	,131



# Reaction of Algerian and international germplasm of wheat against races 1 and 5 of *Pyrenophora tritici-repentis* the causal agent of tan spot

Noureddine Ouair<sup>1</sup> · Abdelkader Benbelkacem<sup>2</sup> · Pawan Kumar Singh<sup>3</sup> · Sabrina Oumata<sup>4</sup> · Hamida Benslimane<sup>5</sup>

Received: 9 January 2021 / Accepted: 12 March 2021  
© Akadémiai Kiadó Zrt. 2021

## Abstract

Tan spot caused by *Pyrenophora tritici-repentis* is an important foliar disease of wheat that can cause high yield losses. In Algeria, tan spot is widely present on both durum and bread wheat, the pathogen population structure was found to be complex and showed a high molecular diversity. Among the various control measures, the most efficient and sustainable approach is the deployment of resistant cultivars. In this study, available germplasms of wheat, including 25 inbreeding lines, 54 landraces, and 37 cultivars were evaluated against races 1 and 5. Reaction of the 116 genotypes was initially evaluated under controlled conditions in seedling stage, and then the observed resistant genotypes, were evaluated in field in order to confirm their reaction against each race. Our results showed that a total 13 genotypes including inbreeding lines, landraces and cultivars showed resistant or moderately resistant reaction to race 1, while 23 genotypes, showed resistant response to race 5. However, only 1 landrace and 6 cultivars were resistant to both races 1 and 5. Genotype-resistant response in field in adult plant was similar to one recorded on growth room. These results have allowed us to recommend cultivation of some cultivars, according to races prevalent in Algerian regions, as well as recommending breeders to use the resistant sources in their breeding programs. For our knowledge, this is the first report of germplasm evaluation against tan spot disease in Algeria, and the first report of identification of resistant resources to this disease.

**Keywords** Breeding · Race 1 · Race 5 · Resistance · Tan spot · Wheat

✉ Noureddine Ouair  
n.ouair@edu.ensa.dz

- <sup>1</sup> Phytopathology and Molecular Biology Laboratory, Department of Botanic, National High College of Agriculture, 1, Avenue Pasteur, Hassan Badi, El-Harrach, Algiers, Algeria
- <sup>2</sup> Unité de Recherche de Constantine, Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie, Station ITGC, El-khroub, Algeria
- <sup>3</sup> International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Carretera México-Veracruz Km. 45, El Batán, Texcoco, C.P. 56237, México
- <sup>4</sup> Division des Ressources Phylogénétiques, Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie, Avenue des frères Oudek, Hassan Badi, El-Harrach, Algiers, Algeria
- <sup>5</sup> Integrative Improvement of Crop Production Laboratory (Amélioration Intégrative des Productions Végétales C2711100), Department of Botanic, National High College of Agriculture, 1, Avenue Pasteur, Hassan Badi, El-Harrach, Algiers, Algeria

## Introduction

The fungus *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (anamorph: *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem.) causes tan spot of wheat (Shoemaker 1962). Being endemic to major wheat growing areas worldwide, tan spot is a devastating disease in wheat (*Triticum aestivum* L.) and durum (*T. durum* L). In favorable weather conditions, it can cause yield losses of up to 50% (Rees and Platz 1983; Shabeer and Bockus 1988).

When *P. tritici-repentis* infects susceptible wheat germplasm, necrotic or chlorotic symptoms are induced due to the interaction of host-selective toxins produced by different races (Lamari and Bernier 1989a; Strelkov et al. 1999; Lamari et al. 2003) which function as virulence factors (Lamari and Bernier 1989b; Orolaza et al. 1995; Effertz et al. 2002). Today, three host-specific toxins, Ptr ToxA, Ptr ToxB and Ptr ToxC, have been identified and characterized in the 8 known races. Ptr ToxA induces necrosis on sensitive wheat cultivars (Ballance et al. 1989; Toma's et al.

1990; Zhang et al. 1997). It is produced by races 1, 2, 7 and 8 (Lamari et al. 2003), so by approximately 80% of isolates (Oliver and Solomon 2008). Ptr ToxB is responsible of chlorosis symptoms in sensitive wheat genotypes, and it was identified in isolates of races 5 (Orolaza et al. 1995), 6, 7 and 8 (Strelkov and Lamari 2003). While Ptr ToxC causes extensive chlorosis, it was found to be produced by races 1, 3, 6 and 8 (Strelkov and Lamari 2003).

Currently, there are three known effector-dominant susceptibility gene interactions: ToxA-*Tsn1*, which induces necrotic symptoms, ToxB-*Tsc2* and ToxC-*Tsc1*, both causing chlorosis symptoms (Faris et al. 2013). The ToxA-*Tsn1* interaction is the best-characterized host-effector interaction identified in wheat (Moffat et al. 2014). According to Lamari et al. (2003), this interaction follows an inverse gene-for-gene model; genotypes without the *Tsn1* gene are insensitive to the toxin (Lamari and Bernier 1991; Faris et al. 1996; Gamba et al. 1998; Anderson et al. 1999; Friesen et al. 2003). However, Adhikari et al. (2009) hypothesize that recognition of ToxA via *Tsn1* may activate important genes involved in both the host defense response and signaling pathways. In the same way, Chu et al. (2010) have speculated that recognition of ToxA by *Tsn1* leads to downstream signaling even though Ptr ToxA itself does not directly interact with *Tsn1*. Although *Tsn1* confers sensitivity, it contains domains such as S/TPK and NBS-LRR, which are common features of resistance genes (Chu et al. 2010). The Ptr ToxB-*Tsc2* interaction has been explained as much as 69% of the variation in disease caused by race 5 (Friesen and Faris 2004). Therefore, a compatible *Tsc2*-Ptr ToxB interaction plays a major role in the development of tan spot (Abeysekara et al. 2010).

In Algeria, where wheat is the most important cereal grown and consumed, as well as where this crop is a basis of diet and a main source of energy and protein, tan spot has become one of the most damaging diseases (Hamadache 2013). Its damages are severe in durum wheat, while they are significant in bread wheat (Sayoud and Benbelkacem 1996). Severity and incidence of this disease is high in coastal areas, average in interior plains and low in high lands (Sayoud et al. 1999). Races 1 and 7 of *P. tritici-repentis* are predominant in this country, and a complex race structure has been observed (Benslimane et al. 2011; Benslimane 2018). However, the main cultivars used are very susceptible to tan spot disease, and no resistant resource was identified until now.

In the context of an integrated plant disease management strategy, a combination of several tools for disease control is necessary. In the case of tan spot, using resistant wheat cultivars in combination with appropriate crop rotation is the best option for sustainable management of this disease. Furthermore, it is the most economical and environmentally safe means of disease control. For this purpose, breeding

for resistant wheat cultivars should be one of the main objectives in tan spot management strategy, which need to conduct a disease evaluation for germplasm including elite breeding lines, landraces, cultivars, which could harbor a new resistant resource. However, evaluation of wheat germplasm for resistance to leaf spot diseases in the field is complicated by competition between other leaf-spotting pathogens (Engle et al. 2006). In addition, mixed infection of leaf spot pathogens that produce similar lesions making it difficult to evaluate reaction of genotypes to individual races or pathogens causing leaf spots (Ali et al. 2007). A high correlation between reaction of wheat to tan spot in controlled conditions and in field was previously reported (Evans et al. 1999; Sarova et al. 2002). For this purpose, the current research was conducted in both control and field conditions; its main objective is to evaluate seedling reaction of available germplasm, against race 1 and race 5 under growth room conditions. The observed growth room resistant genotypes against each race were then evaluated in field.

## Materials and methods

### Growth room evaluation

#### Plant material

One hundred sixteen (116) genotypes including 25 inbreeding lines; 54 landraces; and 37 cultivars were selected for this study, they were provided by the National Institute of Agronomic Research of Algeria (INRAA) (Online Resource 1). All inbreeding lines and cultivars are durum wheat, while landraces include durum wheat as well as bread wheat. The inbreeding lines were selected among the national program for wheat breeding conducted by the National Institute of Agronomic Research of Algeria. They are all advanced lines later than F<sub>7</sub> generation, obtained through a modified bulk method process. Landrace cultivars are provided from the national wheat collection, seed multiplication was carried by the same institute. Among them, 40 landraces were chosen among wheat used in Algerian oases, located in Adrar and Tamanrasset departments (South of Algeria). Farmers assume that they are landraces grown since long time in this area; they prefer to cultivate them because of their ability to face local constraints conditions, their grain characteristics and grain end-use (Oumata et al. 2020). These genotypes showed interesting agronomic characters as a good productive and tillering, late maturing, high spike fertility, beautiful light yellow grain and resistant to wind (Oumata et al. 2020). As a potential germplasm which could be included in the breeding programs, disease reaction should be evaluated. Salamouni was used as a resistant control because its

insensitivity against all known Ptr toxins, and Glenlea as sensitive control; they were included in all tests.

### Seedlings production

Seedlings were grown in pots containing each one a mixture of soil, sand and peat (1/3, 1/3, 1/3). Five to six seed were planted in each pot and placed in growth room; at two leaves stage, thinning was conducted, and three plants were kept for inoculation. Seedlings were maintained under 18 h photoperiod and at 22/20 °C (day/night) temperature. Each genotype was replicated three times. Seedlings were watered and fertilized as needed.

### Inoculum preparation

For this purpose, two isolates from the referential races provided by Dr S. Ali, SDSU, Brookings, USA, were used; Pti2 (race 1) and DW7 (race 5). Conidial suspension of the isolates of the two races 1 and 5 were produced on V8-PDA as described by Lamari and Bernier (1989a). A disk of 5 mm in diameter was removed from the periphery of the colony of each isolate and placed in the center of Petri dishes containing V8-PDA medium. The dishes were incubated in the dark at about 22 °C for 5 days until the mycelia reach up to 2 cm from the Petri dishes edges. The plates were then flooded with distilled sterile water, and the mycelium was flattened with the bottom of a flamed test tube, and the excess water was removed. Cultures incubation was ensured by the alternation of continuous white light for 18 h at about 20 °C, then in the dark for 24 h at 15 °C. To harvest conidia, cultures were flooded with sterilized distilled water, then removed from conidiophores using a wire loop; suspension was finally poured in a sterile Erlenmeyer, which they were plunged in ice. Inoculum concentration was adjusted to  $3.5 \times 10^3$  conidia/ml with sterile distilled water. One drop of Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate) was added per 100 ml of spore suspension.

### Inoculation

Wheat seedlings were inoculated at two–three leaf stage; plants were sprayed with the spore suspension until runoff, using a hand sprayer. Plants inoculated by each of the two races were separated from each other. After inoculation, plants were maintained under moisture saturation (80 to 100%) for 24 h in growth room. The moist chambers were provided through keeping each pot, into a sealed plastic bags, into which air was blown and distilled water was sprayed. The mist was maintained inside of the bag, by spraying water when needed. Then bags were removed and plants were set under 18 h photoperiod and at temperature of 22/20 °C (day/night). For confirmation purpose,

genotypes found to be resistant against each race were inoculated together a second time with four replications for each treatment.

### Plants reaction evaluation

Plant reaction was rated after 6 to 8 days, according to a scale of 1 to 5 reported by Lamari and Bernier (1989a). This scale based on lesion type to categorize host reactions to *P. tritici-repentis* was rated numerically as follows: 1 = Small dark brown to black spots without any surrounding chlorosis or tan necrosis (resistant); 2 = small dark brown to black spots with very little chlorosis or tan necrosis (moderately resistant); 3 = small dark brown to black spots completely surrounded by a distinct chlorotic or tan spot necrotic ring; lesions generally not coalescing (moderately resistant/moderately susceptible); 4 = small dark brown or black spots completely surrounded with chlorotic or tan spot necrotic zones; some of the lesions coalescing (moderately susceptible); and 5 = the dark brown or black centers may or may not be distinguishable; most lesions consist of coalescing chlorotic or tan necrotic zones (susceptible). Infected seedlings rated of 1–2 are considered as resistant, while 3–5 are susceptible (Lamari & Bernier 1989a). A unique score was attributed for the three inoculated seedlings for each replicate, when inbreeding lines, cultivars and landraces were assessed for disease. However, a score was attributed for each seedling when landraces from south regions were assessed; mean value of each replicate was then calculated.

### Data analysis

Wheat reactions against two races 1 and 5, were analyzed using Kruskal–Wallis test (one-way ANOVA on ranks). Statistical analysis was conducted using SPSS software (IBM, SPSS, Statistics, version 23.0.0.0).

### Field conditions evaluation

Responses of genotypes rated 1 or 2 under controlled conditions were evaluated to artificial inoculation of races 1 and 5 under field conditions, over 2018/19 season, at the experimental station of the National High College of Agriculture (E.N.S.A), Algiers. Two separate trials were conducted: the first included seven selected genotypes (4, 26, 98, 99, 103, 107 and MIKI 3) against race 1; the second included 13 genotypes (3, 9, 17, 31, 36, 82, 85, 89, 90, 94, 96, MIKI 3 and ADJINI) used against race 5.

### Seedling and fungicides treatments

The experimental design was a Criss-Cross/split plot with three randomized blocks, separated by an alley 1 m wide.

Each block was subdivided into number of plots equivalent to the number of genotypes evaluated which are randomly assigned. Plots were separated from each other by a blank row of 25 cm, each plot has an area of 2 m<sup>2</sup> (8 rows × 1 m × 0.25 m spacing), and it consisted of eight rows, which were 1 m long. Each row was hand sown with 25 wheat seed. The subplots were sprayed with propiconazole (Tilt, Bayer, Germany) or with conidia of *P. tritici-repentis*. A plastic film of 1.5 m high was placed at the midpoint of the plot when fungicide was applied to prevent the fungicide from drifting onto the tan spot-inoculated subplot. Fungicide was sprayed twice in each trial, using hand-sprayer according to the dose recommended by the manufactory. Treatments were applied 3 weeks from each other, at early tillering stage and two days before inoculation, respectively.

### Inoculum preparation and inoculation

Inoculum was prepared according to Lamari and Bernier (1989a), as described above; then, spore suspensions were adjusted using sterile distilled water to a concentration of  $4 \times 10^3$  spores/ml, in a 10 l hand-sprayer. Irrigation of the experimental plots was carried out before inoculation to ensure high relative humidity in the field. Inoculation of untreated subplots with fungicides was carried out at the end of the day before sunset, at the tillering stage (26–29) and Stem elongation (30–32) (Zadoks et al. 1974). Finally, a plastic covering over all the plots, at 1 m height from the soil, was installed following inoculation, in order to keep a high humidity for at least 18 h after inoculation, which is needed for infection.

### Plants reaction evaluation

Plant reaction was rated 10, 20, 30 and 40 days after inoculation on the penultimate leaves, using two scales. Disease symptoms were evaluated as reported by Lamari and Bernier (1989a) according to lesion type, from 1 to 5 as described above. Moreover, the percent of the diseased leaves area covered by tan spot symptoms was recorded.

## Results

In this study, we evaluated the reaction of 116 wheat genotypes: including 25 inbreeding lines; 54 landraces; and 37 cultivars, against race 1 and race 5. Cultivar Salamouni was used as resistant check, while Glenlea was used as susceptible check. Disease evaluation experiments were conducted firstly on seedlings at two-leaf stage in the growth room. Then, material assessed resistant was evaluated on field for confirmation. However, because of poor seeding of MIKI 3

and ADJINI, these two resistant genotypes were excluded, when material were re-evaluated in field conditions.

### Growth room conditions evaluation

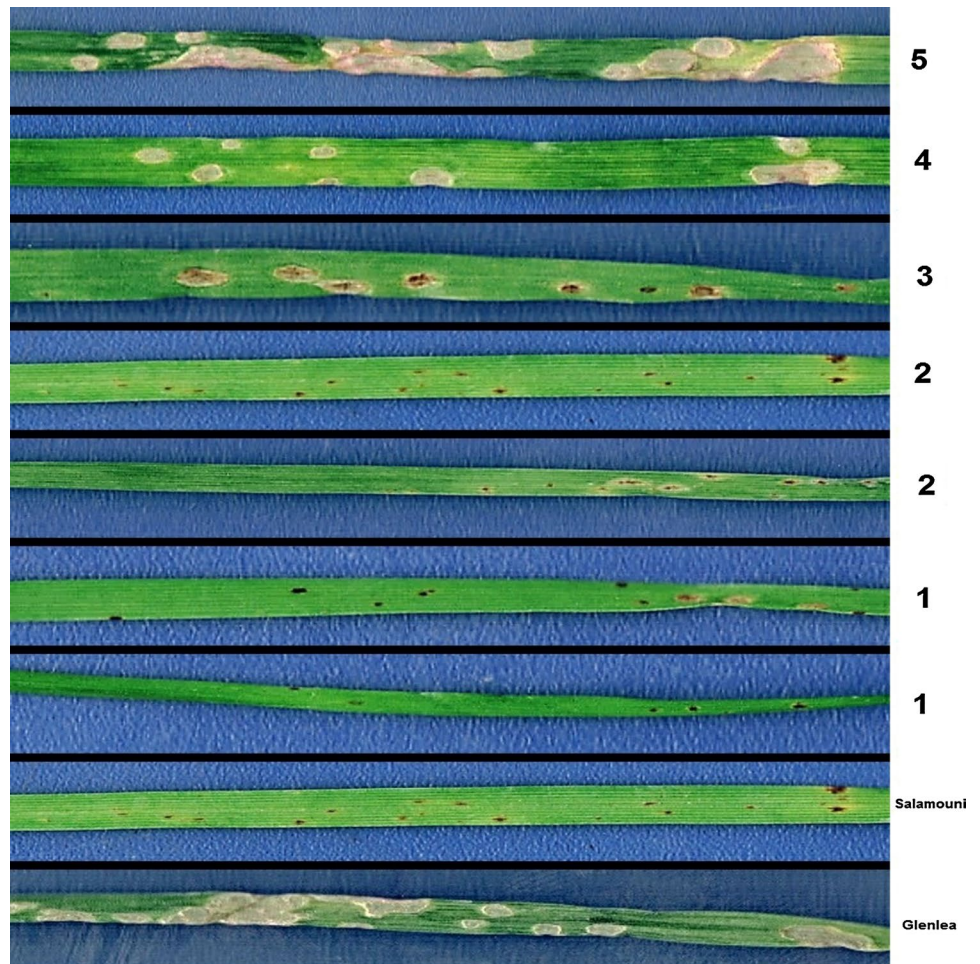
After 24 h of incubation under continuous humidity, it was possible to check the infection success, which was expressed by small lesions on the inoculated leaves. Very small dark green spots that shown conidial germ tubes cuticular penetration, characterized these lesions. The first symptoms have been developed 3 days post inoculation, but reaction assessment of plants was done after 6 to 8 days. The resistant cultivar Salamouni showed relatively little visible response to the fungus after first 3 days inoculation, although some small dark brown to black spots typical of resistance were beginning to form with no necrosis or chlorosis reaction, both to race 1 and 5 (Fig. 1). The sensitive cultivar Glenlea also showed resistance reaction by developing small dark brown to black spot reaction to race 5, while its reaction to race 1 showed a tan necrosis on its leaves (Fig. 1).

The reaction of each genotype is reported on (Online Resource 2), while all results are summarized in Table 1. Among the germplasm evaluated, in case of resistant genotypes, by 3 days post-inoculation, small dark brown to black spots at the infection site with no or little yellowing/chlorosis were observed surrounding the infection site or elsewhere on the leaf. Six to eight days post inoculation, these spots have remained the same size and/or have slightly increased (Fig. 1; lesion type 1 and 2). However, the sensitive wheat genotypes showed necrotic lesions, with sometimes surrounding of tan chlorosis typical of the disease interaction (Fig. 1) and after six days post inoculation these lesions had increased in size and severity. Each of the sensitive genotypes had developed large, severe, coalescing lesions typical of tan spot disease caused by both of races 1 and 5 at 8 days post-inoculation, and this was observed for both bread and durum wheat sensitive genotypes (Fig. 1).

Under the growth room conditions, our results indicate a variation among genotype reactions, against *P. tritici-repentis* (Online Resource 2). A Kruskal–Wallis H test showed that there was a statistically significant difference in score reaction between the different genotypes;  $\chi^2(115) = 334,042$ ,  $p = 0.000$ , for race 1, and  $\chi^2(115) = 347,000$ ,  $p = 0.000$ , for race 5. Thirteen (13) inbreeding lines, landraces and cultivars (11%) showed resistant to moderately resistant reaction to race 1 (lesion type 1–2). While 8 of them (7%) showed moderately resistant/moderately sensitive (lesion type 3), the rest (82%) showed sensitive to moderately sensitive reaction (lesion type 4–5) (Table 1).

On the hand, 23 inbreeding lines, landraces and cultivars (20%) showed resistance to race 5 (lesion type 1–2), while the moderately resistant to moderately sensitive (lesion type

**Fig. 1** Range of reactions (lesion types) induced in wheat leaves by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. Glenlea: reaction of the cultivar Glenlea to race 1 (sensitive), Salamouni: reaction of the cultivar Salamouni to both races 1 and 5 (resistant), 1: lesion type 1 (resistant), 2: lesion type 2 (moderately resistant), 3: lesion type 3 (moderately resistant/moderately sensitive), 4: lesion type 4 (moderately sensitive), 5: lesion type 5 (sensitive)



**Table 1** Lesion types, plant reactions and number of genotypes assessed for each one, against races 1 and 5 of *Pyrenophora tritici-repentis*

Race 1 (Pti2)				Race 5 (DW7)					
Lesion type	Reaction	Number of genotypes	Total number of genotypes	Lesion type	Reaction	Number of genotypes	Total number of genotypes		
1	R	Inbreeding lines	1	7	1	R	Inbreeding lines	3	15
		Landraces	1				Landraces	3	
		Cultivars	5				Cultivars	9	
2	MR	Inbreeding lines	0	6	2	MR	Inbreeding lines	1	8
		Landraces	1				Landraces	2	
		Cultivars	5				Cultivars	5	
3	MR/MS	Inbreeding lines	0	8	3	MR/MS	Inbreeding lines	4	11
		Landraces	6				Landraces	4	
		Cultivars	2				Cultivars	3	
4	MS	Inbreeding lines	16	58	4	MS	Inbreeding lines	6	42
		Landraces	29				Landraces	28	
		Cultivars	13				Cultivars	8	
5	S	Inbreeding lines	8	37	5	S	Inbreeding lines	11	40
		Landraces	17				Landraces	17	
		Cultivars	12				Cultivars	12	

3) reaction to *P. tritici-repentis* inoculation was determined in 11 of them (9%). The rest of tested genotypes (71%) showed an evident susceptibility to race 5 (lesion type 4–5) (Table 1).

Finally, analysis of reactions reported in Online Resource 2; highlighted, that among the 116 germplasm evaluated, only 1 landraces and 6 cultivars (6%) are resistant to both races 1 and 5, as they developed lesion type reaction between 1 and 2 (Table 1).

### Field conditions evaluation

Ten- and fifteen-days post inoculation, symptoms were observed in plants evaluated against race 1 and race 5, respectively. These, were small dark brown to black spots, sometime surrounded with a reduced chlorosis, similar to resistance symptoms, rated 1. After thirty (30) days post inoculation, some necrosis spots increased in size and became rated 2 (Table 2). At the end of our observations while leaves still green, areas of leaves under disease varied from 5 to 20%, in both trials. Diseased leaves areas have slightly increased on some genotypes, disease extension did not increase by more than 5%. However, for the most genotypes, the diseased leaf area remained the same throughout the evaluation period (Table 2). Our results showed that genotype responses to races 1 and 5 in field conditions were

like that observed in greenhouse experiments. Hence, we identified germplasm showing resistant reaction to tan spot under seedling reaction in greenhouse.

### Discussion

The complexity of the *P. tritici-repentis* population structure in Algeria gives the importance of conducting replicated experiments and analysis, for characterizing national germplasm and select resistant resources. In this study, disease evaluation was conducted on seedlings at two-leaf stage in the growth room, then in field. The choice of the two races was based on the predominance of race 1 (ToxA + ToxC) worldwide and in Algeria, while race 5 (ToxB) was included to allow as to evaluate germplasm sensitivity, against the three virulence factors known. In fact, screening for tan spot at the seedling stage is often preferred to allow the most susceptible materials to be discarded before confirmation of field resistance (Singh et al. 2012).

Our results showed typical known reactions of Glenlea and Salamouni to both races, which expressed necrosis (Glenlea against race 1) and small black to dark brown lesions (Salamouni against race 1 and Glenlea and Salamouni against race 5). The two genotypes were used as a check in all inoculations. In fact, the hexaploid landrace Salamouni

**Table 2** Plant wheat reactions against races 1 and 5 of *P. tritici-repentis* under field conditions

Genotype	10 days post-inoculation		20 days post-inoculation		30 days post-inoculation		40 days post-inoculation	
	Score <sup>a</sup>	IL (%) <sup>b</sup>	Score	IL (%)	Score	IL (%)	Score	IL (%)
<i>Reaction of tested genotypes against race 1</i>								
4	1	10	1	10	1 (2)	10	1 (2)	10
26	1	20	1	20	1	20	1	20
98	1	10	1	10	1	10	1 (2)	10
99	1	20	1	20	1 (2)	20	1 (2)	20
103	1	10	1	10	1 (2)	10	1 (2)	10
107	1	15	1	15	1	20	1	20
<i>Reaction of tested genotypes against race 5</i>								
3	1	5	1	5	1 (2)	10	1 (2)	10
9	1	5	1	5	1	5	2	10
17	1	5	1	5	1	5	1	5
31	1	5	1	5	1	10	1	10
36	1	5	1	5	1	5	1	5
82	1	5	1	5	1	5	1	5
85	1	5	1	5	1	5	1 (2)	5
89	1	5	1	5	1	10	1	10
90	1	5	1	5	1	10	1	10
94	1	5	1	5	1	5	1 (2)	5
96	1	5	1	5	1 (2)	5	1 (2)	10

<sup>a</sup>Score according to lesion type

<sup>b</sup>Percentage of infected leaves

has been considered a durable tan spot resistance source and used in the differential set as the line that is universally resistant to all races (Lamari et al. 1998). Glenlea was known to be susceptible to race 1 induced necrosis (Lamari et al. 2003) and resistant to race 5 (Orolaza et al. 1995).

Wheat seedlings disease evaluation has been reported as an effective strategy for reactions assessment against *P. tritici-repentis* (Singh et al. 2012), because the susceptibility of seedlings is highly correlated with that of the adult plants in the field (Evans et al. 1999; Sarova et al. 2002; Kalia et al. 2018). Hence, our results allow us to recommend the use on cultivation, of some tested genotypes; this should be conducted according to *P. tritici-repentis* races distribution (Benslimane et al. 2011), in Algerian fields. As well as they highlighted other genotypes which could be included in breeding programs, aimed to bring together several desirable traits, including resistance to tan spot.

According to the reactions recorded, only a few elite breeding lines, landraces and cultivars tested, showed a moderate to high level of resistance, while most of them possessed a moderate to high level of susceptibility. Those, which have shown a high or good level of resistance, rated 1 and 2, should be planted in fields according to races distribution in Algerian wheat growing areas. In fact, they were selected for several interesting agronomic traits including yield, adaptation to climatic conditions as tolerance to drought, grain quality and late and early sowing. Hence, they are well adapted to the cereals growing areas in Algeria. Therefore, we recommend genotypes 4, 26, 98, 99, 103, 111 and 114 rated 1 and genotypes 37, 106, 107, 109, 112 and 113 rated 2 when race 1 has been inoculated (Online Resource 2), for cultivation in regions of Tipaza, Ain Defla, Medea, Algiers, Boumerdes, Bouira, Mila, Constantine and Annaba, where race 1 is highly spread. However, genotypes 3, 9, 17, 36, 38, 60, 82, 85, 89, 98, 99, 103, 108, 113 and 114 rated 1 and genotypes 18, 26, 31, 90, 94, 96, 100 and 107 rated 2 against race 5 (Online resource 2), should be used in culture in Mila and Guelma, where race 5 was reported to be predominant. These race-specific resistances considered as easily detected with specific pathotypes or races of the pathogen are controlled by genes having major effects (Singh and Rajaram 2002).

Given the nature of plant–pathogen interaction known for tan spot disease, the resistance controlled by a major gene is unlikely to be bypassed as quickly as in a classical gene-for-gene pathosystem. Indeed, in the *P. tritici-repentis*-wheat pathosystem, the interaction follows the toxin model; to cause disease, each host-specific toxin must be binded to a specific receptor harbored by the host. Thus, the sensitivity results from the presence in the host of a specific receptor, while its absence would lead to resistance. In order to overcome the resistance of the cultivars, the fungus will have to produce a new toxin.

Moreover, an inverse mutation involving a gain of function in the host plant, allowing a specific receptor acquisition of the new toxin will also needed. The probability that both events occur at the same time is very unlikely (Singh et al. 2010). Incorporation of major-type resistance genes into currently grown wheat varieties seems an appropriate strategy. However, a survey of races distribution evolution is always an important action in tan spot management.

In areas where other races are widespread, cultivars that have race non-specific resistance should be grown; in fact, race-non-specific resistances operate against all pathotypes or races (Singh and Rajaram 2002). Faris and Friesen (2005) suppose that race-non-specific resistance mechanisms decrease toxin activity in plants and render them resistant before the manifestation of necrosis by the toxin.

This will be very useful as races distribution showed that race 5 is the unique base race occurs in Algeria; while others are recombined races. Hence, wheat cultivars resistant to both race 1 and 5 (26, 98, 99, 103, 107, 113 and 114) can be recommended for those regions where races 6, 7 and 8 were reported (regions like Mascara, Tipaza, Ain-Defla, Blida, Medea, Algiers, Boumerdes, Bouira, Tizi-Ouzou, Béjaïa) (Benslimane et al. 2011). They also can be sources of resistance and used to develop new inbreeding lines that will be insensitive to two or three virulence genes. This allows bring together, the insensitivity against two or three virulence factors Ptr ToxA, Ptr ToxB and Ptr ToxC, harbored by races 6, 7 and 8 successively. In fact, growing crops heterogeneous for their R (resistant) gene complement inflicts disruptive selection upon the pathogen population, reducing the selection pressure against any one avirulence or combination of avirulence alleles and has been proposed as a strategy in developed agriculture for controlling crop diseases by the use of multi lines (Browning and Frey 1969) or variety mixtures (Wolfe and Barrett 1980). There is convincing evidence that crop heterogeneity for R gene complement reduces the incidence of disease in modern agricultural systems (Wolfe and Finck 1997).

Otherwise, the pedigree of resistant sources identified in this study indicates that they come from diverse genetic background (Online Resource 1); hence, they may possibly possess different resistance genes. These genotypes can be used in gene pyramiding and developing cultivars with broad and durable resistance to tan spot.

However, genotypes which have been moderately sensitive/sensitive to race 1 and/or race 5 should be avoided in wheat fields, across these areas, especially where favorite conditions of tan spot development are combined. If they will be used for some of their agronomic characters, they may be a potential source for survival of both races in Algerian fields. Resistance of accessions could be the results of several causes; in fact both qualitative and quantitative



resistance types have been reported in the wheat-*P. tritici-repentis* system.

However, several genotypes exhibited moderately resistant to moderately susceptible (rate 3), indicating that more than one gene may be involved in conditioning resistance to these isolates (Effertz et al. 2001). In this context, wheat resistance was also found to be quantitative by several researches (Nagle et al. 1982; Elias et al. 1989; Faris et al. 1997; Effertz et al. 2002; Friesen and Faris 2004), because the reactions are affected by genotypic backgrounds, variations in environmental conditions and experimental error (Faris et al. 2013). It was qualified as complex, do not following a Mendelian transmission (Nagle et al. 1982), with a polygenic inheritance (Elias et al. 1989). Both authors group's studies indicated good heritability of resistance, which was quantitatively controlled. These resistant genotypes should be of greater interest because they could be incorporated into a program to improve resistance to this disease.

Resistance resources have been reported worldwide and among diverse materials; Rees and Platz (1990) and Riede et al. (1996) evaluated a collection of Brazilian and Chinese wheat varieties; they found that they possess a good resistance to this disease. As well as Gilchrist (1992) reported resistance to tan spot in Brazilian, Chinese and Mexican lines. Later, Singh et al. (2006a) evaluated 126 adapted durum and hard red spring wheat cultivars and breeding lines from the Prairie region of northern Great Plains of the United States and Canada found ten genotypes showing high level of resistance to multiple races of *P. tritici-repentis* and their toxins. A good resistance to tan spot has been founded also among few commonly grown cultivars in Denmark (Jorgensen and Olsen 2007), among bread and durum wheat belonging to 6 continents Africa, Asia, Australia, Europe, North America and South America (Noriel et al. 2011; Abdullah et al. 2017; Kokhmetova et al. 2017), and among Vavilov accessions, including durum and bread wheat, from Pakistan Russia and India (Dinglasan et al. 2018). Otherwise, a high level of resistance to tan spot associated to multiple leaf spot diseases have been also highlighted by several authors who evaluated germplasm from different sources (Sharma et al. 2004; Singh et al. 2006b; Ali et al. 2007; Oliver et al. 2008; Gurung et al. 2009). Additionally, wild relative species of wheat are an outstanding source of resistance to both abiotic and biotic stresses (Ahmadi et al. 2018). In the case of tan spot disease, Chu et al. (2008) showed that wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) is a good genetic source of resistance to tan spot and SNB in wheat as well as lines derived from *Agropyron distichum* were found applicable as sources of resistance in resistance breeding (Riede et al. 1996).

The use of resistant cultivars is the most effective and economic means to fight against and to reduce yield losses

caused by tan spot disease (Zhang et al. 1997; Friesen and Faris 2004; See et al. 2018). This is the first investigation of resistance resources to tan spot disease in Algeria. Its results should be a useful tool for a successful cultivars deployment, according to the race distribution in this country. Otherwise, they are an interesting data, providing a useful background for future wheat breeding programs, aimed screening genotypes for multiple diseases resistance.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s42976-021-00161-1>.

**Acknowledgements** We thank Dr. Ali S., from South Dakota State University, Brookings, USA, for supplying us two referential isolates of *P. tritici-repentis*.

**Author contributions** Mr. NO carried out the experiment and statistical analysis, and he wrote the manuscript under supervising of Dr. HB. Dr. AB and Mrs. SO are breeders who selected and provided evaluated germplasm. Dr. PKS has reviewed and conducted a critical revision of the manuscript. Dr. HB has supervised the project; she conceived the study and was in charge of overall direction and planning, as well as writing the manuscript.

**Funding** The authors did not receive support from any organization for the submitted work.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors have no conflicts of interest to declare that are relevant to the content of this article.

**Ethical approval** This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

## References

- Abdullah S, Sehgal SK, Jin Y, Turnipseed B, Ali S (2017) Insights into tan spot and stem rust resistance and susceptibility by studying the pre-Green revolution global collection of wheat. *Plant Pathol J* 33:125–132. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2016.0157>
- Abeysekara NS, Friesen TL, Liu Z, McClean PE, Faris JD (2010) Marker development and saturation mapping of the tan spot Ptr ToxB sensitivity locus *Tsc2* in hexaploid wheat. *Plant Genome* 3:179–189. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2016.0157>
- Adhikari TB, Bai J, Meinhardt SW, Gurung S, Myrfield M, Patel J, Ali S, Gudmestad NC, Rasmussen JB (2009) *Tsn1*-mediated host responses to ToxA from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 22:1056–1068. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2016.0157>
- Ahmadi J, Pour-Aboughadareh A, Ourang SF, Mehrabi AA, Siddique KHM (2018) Wild relatives of wheat: *Aegilops triticum* accessions disclose differential antioxidative and physiological responses to water stress. *Acta Physiol Plant* 40:90. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2016.0157>
- Ali S, Singh PK, McMullen MP, Mergoum M, Adhikari TB (2007) Resistance to multiple leaf spot diseases in wheat. *Euphytica* 159:167–179. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2016.0157>
- Anderson JA, Effertz RJ, Faris JD, Francl LJ, Meinhardt SW, Gill BS (1999) Genetic analysis of sensitivity to *Pyrenophora*

- tritici-repentis* necrosis-inducing toxin in durum and common wheat. *Phytopathology* 89:293–297. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2016.0157>
- Ballance GM, Lamari L, Bernier CC (1989) Purification and characterization of a host selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiol Mol Plant Pathol* 35:203–213. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2016.0157>
- Benslimane H (2018) Virulence phenotyping and molecular characterization of a new virulence type of *Pyrenophora tritici-repentis* the causal agent of Tan Spot. *Plant Pathol J* 34:139–142. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2016.0157>
- Benslimane H, Lamari L, Benbelkacem A, Sayoud R, Bouznad Z (2011) Distribution of races of *Pyrenophora tritici-repentis* in Algeria and identification of a new virulence type. *Phytopathol Mediterr* 50:203–211. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-8746](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-8746)
- Browning JA, Frey KJ (1969) Multiline cultivars as a means of disease control. *Annu Rev Phytopathol* 7:355–382
- Chu CG, Friesen TL, Faris JD, Xu SS (2008) Evaluation of seedling resistance to tan spot and *Stagonospora nodorum* blotch in tetraploid wheat. *Crop Sci* 48:1107–1116. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.09.0516>
- Chu CG, Chao S, Friesen TL, Faris JD, Zhong S, Xu SS (2010) Identification of novel tan spot resistance QTLs using an SSR-based linkage map of tetraploid wheat. *Mol Breed* 25:327–338. <https://doi.org/10.1007/s11032-009-9335-2>
- Dinglasan EG, Godwin ID, Phan HTT, Tan KC, Platz GJ, Hickey LT (2018) Vavilov wheat accessions provide useful sources of resistance to tan spot (syn. yellow spot) of wheat. *Plant Pathol* 67:1076–1087. <https://doi.org/10.1111/ppa.12822>
- Effertz RJ, Anderson JA, Francl LJ (2001) Restriction fragment length polymorphism mapping of resistance to two races of *Pyrenophora tritici-repentis* in adult and seedling wheat. *Phytopathology* 91:572–578. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.6.572>
- Effertz RJ, Meinhardt SW, Anderson AJ, Jordahl JG, Francl LJ (2002) Identification of a chlorosis-inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* and the chromosomal location of an insensitivity locus in wheat. *Phytopathology* 92:527–533. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.5.527>
- Elias E, Cantrell RG, Hosford RM Jr, (1989) Heritability of resistance to tan spot in durum wheat and its association with other agronomic traits. *Crop Sci* 29:299–304. <https://doi.org/10.2135/cropsci1989.0011183X002900020013x>
- Engle JS, Madden LV, Lippe PE (2006) Distribution and pathogenic characterization of *Pyrenophora tritici-repentis* and *Stagonospora nodorum* in Ohio. *Phytopathology* 96:1355–1362. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1355>
- Evans CK, Hunger RM, Siegerist WC (1999) Comparison of greenhouse and field testing to identify wheat resistant to tan spot. *Plant Dis* 83:269–273. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.3.269>
- Faris JD, Friesen TL (2005) Identification of quantitative trait loci for race-nonspecific resistance to tan spot in wheat. *Theor Appl Genet* 111:386–392. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-2033-5>
- Faris JD, Anderson JA, Francl LJ, Jordahl JG (1996) Chromosomal location of a gene conditioning insensitivity in wheat to a necrosis-inducing culture filtrate from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology* 86:459–463. <https://doi.org/10.1094/Phyto-86-459>
- Faris JD, Anderson JA, Francl LJ, Jordahl JG (1997) RFLP mapping of resistance to chlorosis induction by *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat. *Theor Appl Genet* 94:98–103. <https://doi.org/10.1007/s001220050387>
- Faris JD, Liu Z, Xu SS (2013) Genetics of tan spot resistance in wheat. *Theor Appl Genet* 126:2197–2217. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2157-y>
- Friesen TL, Faris JD (2004) Molecular mapping of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 5 and sensitivity to Ptr ToxB in wheat. *Theor Appl Genet* 109:464–471. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1678-9>
- Friesen TL, Ali S, Kianian S, Francl LJ, Rasmussen JB (2003) Role of host sensitivity to Ptr ToxA in development of tan spot of wheat. *Phytopathology* 93:397–401. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.4.397>
- Gamba FM, Lamari L, Brülé-Babel AL (1998) Inheritance of race-specific necrotic and chlorotic reactions induced by *Pyrenophora tritici-repentis* in hexaploid wheats. *Can J Plant Pathol* 20:401–407
- Gilchrist SL (1992) Resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in CIM-MYT bread wheat germplasm. In: Francl, L.J., Krupinsky, J.M. & McMullen, M.P. (eds) *Advances in tan spot research: proceedings of 2nd international tan spot workshop*. North Dakota State University, Fargo, North Dakota
- Gurung S, Bonman JM, Ali S, Patel J, Myrfield M, Mergoum M, Singh PK, Adhikari TB (2009) New and diverse sources of multiple disease resistance in wheat. *Crop Sci* 49:1655–1666. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.10.0633>
- Hamadache A (2013) *Eléments de Phytotechnie générale - Grandes cultures - Tome I : le blé*. ITGC, Alger, p 256p
- Jorgensen L, Olsen L (2007) Control of tan spot (*Drechslera tritici-repentis*) using cultivar resistance, tillage methods and fungicides. *Crop Protect* 26:1606–1616. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.01.009>
- Kalia B, Bockus W, Singh S, Tiwari VK, Gill BS (2018) Mapping of quantitative trait loci for resistance to race 1 of *Pyrenophora tritici-repentis* in synthetic hexaploid wheat. *Plant Breed* 00:1–7. <https://doi.org/10.1111/pbr.12586>
- Kokhmetova A, Kremneva O, Volkova G, Atishova M, Sapakhova Z (2017) Evaluation of wheat cultivars growing in Kazakhstan and Russia for resistance to tan spot. *J Plant Pathol* 99(161):167. <https://doi.org/10.4454/jpp.v99i1.3812>
- Lamari L, Bernier CC (1989a) Evaluation of wheat lines and cultivars to tan spot (*P. tritici-repentis*) based on lesion type. *Can J Plant Pathol* 11:49–56. <https://doi.org/10.1080/07060668909501146>
- Lamari L, Bernier CC (1989b) Toxin of *Pyrenophora tritici-repentis* host specificity, significance in disease and inheritance of host reaction. *Phytopathology* 79:740–744. <https://doi.org/10.1094/Phyto-79-740>
- Lamari L, Bernier CC (1991) Genetics of tan necrosis and extensive chlorosis in tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology* 81:092–1095. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-1092>
- Lamari L, Gilbert J, Tekauz A (1998) Race differentiation in *Pyrenophora tritici-repentis* and survey of physiologic variation in western Canada. *Can J Plant Pathol* 20:396–400. <https://doi.org/10.1080/07060669809500410>
- Lamari L, Strelkov SE, Yahyaoui A, Orabi J, Smith RB (2003) The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat. *Phytopathology* 93:391–396. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.4.391>
- Moffat CS, See PT, Oliver RP (2014) Generation of a ToxA knockout strain of the wheat tan spot pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*. *Mol Plant Pathol* 15:918–926. <https://doi.org/10.1111/mpp.12154>
- Nagle BJ, Frohberg RC, Hosford RM (1982) Inheritance of resistance to tan spot of wheat. In: Hosford RM (ed) *Tan spot of wheat and related disease workshop*. North Dakota State University, Fargo
- Noriel AJ, Sun X, Bockus W, Bai G (2011) Resistance to tan spot and insensitivity to Ptr ToxA in wheat. *Crop sci* 51:1059–1067. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.08.0464>
- Oliver RP, Solomon PS (2008) Recent fungal diseases of crop plants: is lateral gene transfer a common theme? *Mol Plant-Microbe Interact* 21:287–293. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-3-0287>
- Oliver RE, Cai X, Wang RC, Xu SS, Friesen TL (2008) Resistance to tan spot and *Stagonospora nodorum* blotch in wheat-alien

- species derivatives. *Plant Dis* 92:150–157. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-1-0150>
- Orolaza NP, Lamari L, Ballance GM (1995) Evidence of a host-specific chlorosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*, the causal agent of tan spot of wheat. *Phytopathology* 85:1282–1287. <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-1282>
- Oumata S, David J, Mekliche-Hanifi L, Kharsi M, Zaharieva M, Monneveux P (2020) Oasis wheats of the South of Algeria: landraces, cultural practices and utilization. *Genet Resour Crop Evol* 67:25–337. <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00874-7>
- Rees RG, Platz GJ (1983) Effects of yellow spot on wheat: comparison of epidemics at different stages of crop development. *Aust J Agric Res* 34:39–46. <https://doi.org/10.1071/AR9830039>
- Rees RG, Platz GJ (1990) Sources of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in bread wheats. *Euphytica* 45:59–69. <https://doi.org/10.1007/BF00032151>
- Riede CR, Franc L, Anderson JA, Jordahl JG, Meinhardt SW (1996) Additional sources of resistance to tan spot of wheat. *Crop Sci* 36:771–777. <https://doi.org/10.2135/cropsci1996.0011183X003600030040x>
- Sarova J, Sip V, Hanzalova A (2002) Response of winter wheat cultivars to artificial infection with *Pyrenophora tritici-repentis* in field and greenhouse conditions. *Plant Protect Sci* 38:575–579. <https://doi.org/10.17221/10559-PPS>
- Sayoud R, Benbelkacem K (1996) Situation des maladies des céréales en Algérie. Paper presented at the Symposium Régional sur Les Maladies des Céréales et des Légumineuses Alimentaires. Rabat Maroc.
- Sayoud R, Ezzahiri B, Bouznad Z (1999) Les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires au Maghreb. ITGC, Alger, p 64
- See PT, Marathamuthu KA, Jagallo EM, Oliver RP, Moffat CS (2018) Evaluating the importance of the tan spot ToxA-Tsn1 interaction in Australian wheat varieties. *Plant Pathol* 67:1066–1075. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00182>
- Shabeer A, Bockus WW (1988) Tan spot effects on yield and yield components relative to growth stage in winter wheat. *Plant Dis* 72:599–602. <https://doi.org/10.1094/PD-72-0599>
- Sharma RC, Sah SN, Duveiller E (2004) Combining ability analysis of resistance to *Helminthosporium* leaf blight in spring wheat. *Euphytica* 136:341–348. <https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000032752.75504.bd>
- Shoemaker RA (1962) Drechslera Ito. *Can J Bot* 40:810–836
- Singh RP, Rajaram S (2002) Breeding for resistance in wheat. In: Curtis BC, Rajaram S, Gomez Macpherson H (eds) Bread wheat: improvement and production, plant production and protection series No. 30. FAO, Rome, pp 317–330
- Singh PK, Mergoum M, Ali S, Adhikari TB, Elias EM, Hughes GR (2006a) Identification of new sources of resistance to tan spot, Stagonospora nodorum blotch, and Septoria tritici blotch of wheat. *Crop Sci* 46:2047–2053. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.12.0469>
- Singh PK, Mergoum M, Ali S, Adhikari TB, Elias EM, Anderson JA, Glover KD, Berzonsky WA (2006b) Evaluation of elite wheat germplasm for resistance to tan spot. *Plant Dis* 90:1320–1325. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1320>
- Singh PK, Singh RP, Duveiller E, Mergoum M, Adhikari TB, Elias EM (2010) Genetics of wheat *Pyrenophora tritici-repentis* interactions. *Euphytica* 171:1–13. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-0074-6>
- Singh PK, Duveiller E, Singh RP (2012) Resistance Breeding for Tan Spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) of Wheat. In: Sharma I (ed) Disease Resistance in Wheat pp 136–150. CABI
- Strelkov SE, Lamari L (2003) Host-parasite interaction in tan spot *Pyrenophora tritici-repentis* of wheat. *Can J Plant Pathol* 25:339–349. <https://doi.org/10.1080/07060660309507089>
- Strelkov SE, Lamari L, Ballance GM (1999) Characterization of a host specific protein toxin (Ptr ToxB) from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 12:728–732. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.8.728>
- Toma's A, Feng GH, Reeck GR, Bockus WW, Leach JE (1990) Purification of a cultivar specific toxin from, *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. *Mol Plant-Microbe Interact* 3:221–224. <https://doi.org/10.1094/MPMI-3-221>
- Wolfe MS, Barrett JA (1980) Can we lead the pathogen astray? *Plant Dis* 64:148–155
- Wolfe MS, Finckh MR (1997) Diversity of host resistance within the crop: effects on host, pathogen and disease. In: Hartleb H, Heitfuss R, Hoppe H-H (eds) Resistance of crop plants against fungi. Gustav Fisher Publ, Jena, pp 378–400
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res* 14:415–421
- Zhang HF, Franc L, Jordahl JG, Meinhardt SW (1997) Structural and physical properties of necrosis inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology* 87:154–160. <https://doi.org/10.1094/phyto.1997.87.2.154>

## RESUME

La tache auréolée du blé causée par le champignon *Pyrenophora tritici-repentis* est l'une des principales maladies qui sévit dans les régions d'Afrique du Nord et du Moyen Orient. Des prospections des zones céréalières en Algérie, réalisées durant les deux campagnes agricoles 2014/2015 et 2015/2016, ont permis de construire une collection de 87 isolats de ce champignon. La caractérisation morphologique des isolats, a montré le développement d'un mycélium épais cotonneux ou très cotonneux, parfois pelucheux, de couleur blanche ou vert-grise, avec généralement la production dans le milieu d'un pigment vert. L'évaluation du pouvoir de sporulation, et de la croissance radiale des cultures à la température optimale 25 °C, ont révélé l'existence d'une différence très hautement significative entre les isolats étudiés. Le maximum de croissance radiale journalière enregistré a été de 6,75 mm, alors que le maximum de sporulation a été de 31297 spores/ml/cm<sup>2</sup> respectivement. La diversité génétique de 85 isolats algériens a été évaluée à l'aide de 8 marqueurs SCoT et 8 marqueurs SSR. Les résultats obtenus ont révélé une variabilité génétique importante. Pour les amorces SCoT, toutes ont donné le polymorphisme recherché avec 143 marqueurs détectés ; le nombre de marqueurs par amorce variait de 9 à 24 mettant en évidence 70 haplotypes. Cependant, pour les amorces SSR, seules 2 amorces ont été polymorphes, un total de 17 marqueurs a été détecté ; le nombre de marqueurs variait de 2 à 15 avec révélation de 40 haplotypes. Dans le but de rechercher une possible variation au niveau de la séquence du gène de virulence ToxA, la collection d'isolats étudiés a été complétée par d'autres, isolés lors des campagnes agricoles 2006/2007 et 2010/2011. En plus des isolats précédents, 44 isolats algériens, 14 isolats tunisiens et 58 isolats syriens, ont été ajoutés. La recherche de ce gène par PCR chez les 213 isolats, nous a permis de conclure qu'il est présent chez 150 isolats soit 70 % de ceux étudiés. Le séquençage et l'alignement des séquences de ce gène obtenus à partir de 25 isolats choisis parmi ceux des 3 pays, ont montré clairement l'existence d'une variation chez deux isolats algériens. Cette dernière est une mutation silencieuse au niveau du 180<sup>ème</sup> codon, résultant de la substitution d'un seul nucléotide (G en A). Cette variation nous a permis d'identifier un nouveau haplotype jamais décrit au paravent chez *P. tritici-repentis*, ni chez autres espèces possédants ce gène. Les deux isolats ayant montrés une variation au niveau de ToxA, ont été identifiés après leur inoculation sur une gamme différentielle, comme appartenant à la race 2 ; il s'agit de la première signalisation de cette race dans les champs algériens. L'infiltration des feuilles de la variété Glenlea (sensible à la toxine Ptr ToxA, produite par le gène ToxA) par les filtrats de cultures des deux isolats, a confirmé que la mutation était silencieuse. Enfin une recherche des sources de résistance à l'égard des deux races 1 et 5 de *P. tritici-repentis*, a concerné 116 génotypes de blé. L'évaluation de la réaction a été réalisée en premier sur des plantules sous conditions contrôlées, suite à un second essai de confirmation de la réaction des génotypes résistants en conditions contrôlées, celle-ci a été confirmée par un essai en plein champ. Les résultats ont montré l'existence de 13 génotypes, résistants à la race 1 et 23 autres résistants à la race 5. Parmi eux, 7 génotypes ont montré une résistance aux deux races. Il s'agit également du premier rapport de sources de résistances à cette maladie en Algérie.

**Mots clés :** *Pyrenophora tritici-repentis*, ToxA, race, diversité génétique, résistance, Sensibilité.

## SUMMARY

Tan spot of wheat caused by the fungus *Pyrenophora tritici-repentis* is one of the main diseases, that rampant throughout North Africa and the Middle East regions. Surveys carried out across cereal growing areas in Algeria during the two growing seasons 2014/2015 and 2015/2016, have allowed us to get a collection of 87 isolates. The morphological characterization of the isolates, showed a thick or thick very cottony mycelium, sometimes fluffy. Its color was white or green-gray color, usually a green pigment is produced in the medium. Sporulation potential evaluation, as well as, radial growth of the cultures at temperature of 25°C, revealed a very high significant difference between the isolates. The maximum daily radial growth recorded was 6.75 mm, while the maximum sporulation was 31297 spores/ml/cm<sup>2</sup> respectively. The genetic diversity of 85 Algerian isolates was evaluated using 8 SCoT and 8 SSR markers. The results revealed an important genetic variability. All SCoT primers used, showed polymorphism through 143 markers detected; their number varied from 9 to 24 for each, highlighting 70 haplotypes. However, only 2 SSR primers were polymorphic showing 17 markers; 2 to 15 for each, highlighting 40 haplotypes. In order to looking for sequence variations in ToxA virulence gene, isolates collected during the 2006/2007 and 2010/2011 growing seasons, were added. This included 44 from Algeria, 14 from Tunisia, and 58 from Syria. PCR conducted on 213 DNA, showed that 150 isolates, which is 70 % of those studied, harbored ToxA. Sequencing and sequences alignment of 25 isolates sequences selected among those of the 3 countries, showed a variation in two Algerian isolates. This variation is a silent mutation at the 180<sup>th</sup> codon, resulting from the substitution of a single nucleotide (G to A). Hence a new haplotype of ToxA never described before neither in *P. tritici-repentis* nor in other species harboring this gene, was identified. Isolates showing ToxA variation were identified through inoculation on a differential set of wheat, as belonging to race 2; this is the first report of this race in Algerian fields. Infiltration of culture filtrates of the two isolates on Glenlea leaves, which is a susceptible Ptr ToxA toxin cultivar, produced by the ToxA, confirmed that mutation is silent. Finally, a search of resistance resources against races 1 and 5 of *P. tritici-repentis*, involved 116 wheat genotypes. Reaction evaluation was carried out, first on seedlings under controlled conditions, following by a second test to confirm resistant genotypes reaction under controlled conditions; then confirmed on field. The results showed 13 genotypes resistant to race 1, and 23 resistant to race 5. Among them, 7 genotypes are resistant to both races. This is also the first report of resistance resources against this disease in Algeria.

**Key Words:** *Pyrenophora tritici-repentis*, ToxA, race, genetic diversity, resistance, Sensitivity.

## ملخص

يعتبر مرض التبقع الصدئي لدى القمح الذي يسببه الفطر *Pyrenophora tritici-repentis* واحد من الأمراض الأكثر شيوعاً عبر أجزاء من شمال إفريقيا والشرق الأوسط سمحت معاينة العديد من الحقول عبر مختلف مناطق زراعة الحبوب في الجزائر خلال الحملتين الزراعيتين 2015/2014 و 2016/2015 من جمع 87 عزلة من هذا الفطر. أظهرت دراسة الخصائص المورفولوجية لمستعمرات تلك العزلات تباين في كثافة الغزل الفطري المنتج الذي كان غالباً ذو مظهر قطني، وأحياناً منقوشاً، أبيض اللون أو رمادي أخضر، مع إنتاج صبغة خضراء في بيئة النمو. أظهر تقييم قدرة التبوغ ومستوى نمو للمستعمرة عند درجة الحرارة المثلى 25 درجة مئوية، وجود فرق كبير بين العزلات المدروسة. كان أقصى نمو يومي لمستعمرة مسجل هو 6.75 مم، بينما سجل 31297 بوغ/مل/سم<sup>2</sup> كحد أقصى للتبوغ على التوالي. أظهرت نتائج تقييم التنوع الجزيئي لـ 85 عزلة جزائرية باستخدام 8 واسمات جزيئية من نوع SCoT و 8 من نوع SSR تبايناً كبيراً. أظهرت جميع البادئات SCoT المستخدمة تعدد مظهري بين العينات، حيث انتجت 143 حزمة متضخمة تراوح عددها من 9 إلى 24 لكل بادئ، مكنت من الكشف عن 70 نمط فردي. في حين ان التعدد المظهري لم يسجل الا من خلال بادئتين SSR، انتجت 17 حزمة متضخمة؛ تفاوت عددها من 2 إلى 5 لكل بادئ، كشفت عن 40 نمط فردي. من أجل البحث عن اختلاف محتمل في تسلسل الحمض النووي لدى المورثة ToxA، اضيفت عزلات أخرى تم جمعها خلال المواسم الزراعية 2007/2006 و 2011/2010. تتكون المجموعة المضافة من 44 عزلة من الجزائر، 14 من تونس و 58 أخرى من سوريا. أظهرت نتائج التنقيب عن المورثة بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) لدى 213 عزلة توأجدها في مجينات 150 عزلة، أي 70 ٪ من المجموع. أظهرت مقارنة تسلسل الحمض النووي لهذه المورثة لدى 25 عزلة اختيرت من البلدان الثلاثة وجود تحور مس عزلتين من الجزائر. يتمثل هذا الأخير في طفرة صامتة ناتجة عن استبدال نيوكليوتيدة واحد (G إلى A). سمحت هذه النتائج من تحديد نمط فردي جديد للمورثة ToxA لم يتم وصفه من قبل لدى *P. tritici-repentis*، او الأنواع الأخرى التي تمتلك هذا الجين. أظهر تلقيح العزلتين على مجموعة اصناف القمح الاختلافية انتمائها الى السلالة 2؛ التي تم اكتشافها لأول مرة في الحقول الجزائرية. أكد الانسلاص الاصطناعي لمرشحات العزلتين خلال انسجة أوراق صنف Glenlea (الحساسية للسم Ptr ToxA، الذي ينتجه جين ToxA) أن الطفرة صامتة. أخيراً من أجل البحث عن مصادر المقاومة ضد السلالتين 1 و 5، قيمت 116 نوعاً وراثياً من القمح. من أجل ذلك تم إجراء تقييم أولي لشتلات القمح تحت ظروف مراقبة، وبعد اختبار ثانٍ لتأكيد مقاومة الاصناف في ظل ظروف مراقبة، تم تأكيد ذلك من خلال تجربة ميدانية في الحقل. أظهرت النتائج وجود 13 صنف مقاوم للسلالة 1 و 23 أخرى مقاوم للسلالة 5، تضمنت 7 أنواع وراثية أظهرت مقاومة لكلتا السلالتين. تعتبر هذه النتائج سابقة في مجال تحديد مصادر القمح المقاومة لهذا المرض في الجزائر.

**الكلمات المفتاحية:** *Pyrenophora tritici-repentis*، ToxA، سلالة، التنوع الجيني، المقاومة، الحساسية