

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة بالحراش
Ecole Nationale Supérieure Agronomique, EL- Harrach

Mémoire

**En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences
Agronomiques**

Option : Biodiversité et Biotechnologie végétales

Thème

**Etude de la diversité génétique de
Fusarium oxysporum Schlenchtend : Fr. f.
sp. *ciceris* (Padwik) Matuo & K. Sato, agent
du flétrissement de pois chiche**

**Présenté par :
Mr DEBBI Ali**

Jury:

Président : Mr KHELIFI L. Maître de conférences ENSA. EL- Harrach

D. de thèse : Mr BOUZNAD Z. Professeur ENSA. EL- Harrach

Examineurs :

Mme LOUANCHI M. Maître de conférences ENSA. EL- Harrach

Mr GUEZLANE A. Maître de conférences ENSA. EL- Harrach

2009/2010..

Remerciement

Je remercie vivement mon directeur de thèse le Pr. Bouznad Z., pour ses précieux conseils, son assistance, sa compréhension et sa patience le long de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude

Je remercie également les membres de jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir aimablement accepté d'examiner ce travail. Mr khelifi L. qui a bien voulu me faire l'honneur de présider cet honorable jury. Mme Louanchi M., pour ses orientations dans la partie de biologie moléculaire et Mr Guezlane A., pour ses orientations dans la partie compatibilité végétative.

Je remercie avec beaucoup d'estime Mr Sellame du G. R. pour son aide dans les analyses statistiques et le dispositif expérimental.

Je tiens à remercier Mr Fettih de l'ITGC qui nous a fourni la semence de pois chiche.

Je manifeste mes remerciements à Mlle Bouregghda H. pour son aide et ses conseils précieux.

Mes profonds respects et plus vifs remerciements vont également à Fatima, Mohammed, Fouzi et tout le personnel du département Botanique.

Je tiens à exprimer mes reconnaissances et ma gratitude à Mlle Ghat N. pour son entière disponibilité et ses aides précieuses dans les moments les plus difficiles.

Mes sincères remerciements vont également à mes amis et collègues, notamment, Hocine Aziri, Yassine Berbar, salime Benkraouache, Adel Moulai, Melle Benslimane H., Mlle Kahina Benhaddadi, Mlle Salhi L., Hayet, Nassim Bendifellah et Mohammed Hamimeche

J'exprime ma reconnaissance, mon dévouement, ma gratitude et mes profonds sentiments à mes parents et mes frères et sœurs pour leur encouragement et leur soutien moral.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Liste des abréviations

AND: acide désoxyribonucléique

AFLP: Amplified fragment length polymorphism

ARN: Acide ribonucléique

BET: Bromure d'éthidium

HPX: Hypoxanthine

ISSR: Inter-simple sequence repeat

NUV: Near ultra violet

PCR: Polymerase chain reaction

PDA: Potato dextrose agar

RAPD: Randomly amplified polymorphic DNA

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

SSR: Simple sequence repeat

LISTE DES TABLEAUX

page

Tableau 1 : Gènes de résistance vis-à-vis des différentes races de <i>F.o.c.</i>	19
Tableau 2 : Collection et origine des isolats de <i>Fusarium</i>	21
Tableau 3 : Identification des mutants non utilisateurs du nitrate par leur croissance sur trois source d'azote	23
Tableau 4 : Echelle de notation pour la fusariose du pois chiche....	26
Tableau 5 : Réaction différentielle des dix génotypes de pois chiche à l'égard des différentes races physiologiques de <i>F.o.c.</i>	26
Tableau 6 : Type et nombre de mutants caractérisés par les trois sources d'azote (nitrate, nitrite et hypoxanthine)	32
Tableau 7 : Réactions des différents cultivars vis-à-vis des différents isolats de <i>F. o. c.</i>	39
Tableau 8 :Analyse de la variance pour les trois périodes de notation à 5%, 0,1% et 0,1%	41
Tableau 9 : Résultats du dosage de l'ADN par spectrophotométrie.....	47

LISTE DES FIGURES

Fig. 1 : Aspect morphologique du <i>Fusarium oxysporum</i>	13
Fig. 2 : (a) Morphologie d'un mutant « nit » sur le milieu MM (b) réaction de complémentation positive, d'auto-compatibilité chez l'isolat O-10/02.....	33
Fig. 3 : Vue générale du dispositif expérimental aléatoire.....	36
Fig. 4 : Symptôme de jaunissement observé sur le cultivar ILC-3279 par l'isolat G-93, 55 jours après inoculation	36
Fig. 5 : Jaunissement observé sur le cultivar BG-212 par l'isolat E-00, 55 jours après l'inoculation	37
Fig. 6 : Jaunissement observé sur le cultivar JG-62 par l'isolat SS-03, 55 jours après l'inoculation	37
Fig. 7 : Symptôme de flétrissement observé sur le cultivar JG-74 par l'isolat K-93, 55 jours après l'inoculation	38
Fig. 8 : Symptôme de flétrissement observé sur le cultivar CPS-1 par l'isolat O-10/02, 55 jours après l'inoculation	38
Fig. 9 : Représentation graphique de l'indice moyen de maladie au 20 ^{ème} jour.....	40
Fig. 10: Représentation graphique de l'indice moyen de maladie au 40 ^{ème} jour.....	40
Fig. 11: Représentation graphique de l'indice moyen de maladie au 60 ^{ème} jour	40
Fig. 12: ACP pour l'indice moyen de maladie au 20 ^{ème} J sur le plan 1-2	43
Fig. 13: ACP pour l'indice moyen de maladie au 40 ^{ème} J sur le plan 1-2.....	43
Fig. 14: ACP pour l'indice moyen de maladie au 60 ^{ème} J sur le plan 1-2.....	44
Fig. 15: ACP pour l'indice moyen de maladie au 60 ^{ème} J sur le plan 1-3.....	44
Fig. 16: ACP pour l'indice moyen de maladie au 60 ^{ème} J sur le plan 2-3.....	45
Fig. 17 : Extraits d'ADN, obtenus par le protocole CTAB X1, à partir de 4 g de mycélium de <i>Fusarium</i>	48
Fig. 18 : Profils d'amplification obtenus avec l'amorce OPF 10	50
Fig. 19 : Profils d'amplification obtenus avec l'amorce OPI 01.....	50
Fig. 20: Représentation schématique des profils d'ADN obtenus sur gel d'électrophorèse par l'amorce OPF 10.....	51

Fig. 21: Représentation schématique des profils d'ADN obtenus sur gel d'électrophorèse par l'amorce OPI 01.....	51
Fig. 22: Classification hiérarchique des isolats de <i>Fusarium</i> avec l'amorce OPF 10 établie par la méthode UPGMA en utilisant le coefficient de Jaccard's.....	54
Fig. 23: Classification hiérarchique des isolats de <i>Fusarium</i> avec l'amorce OPI 01 établie par la méthode UPGMA en utilisant le coefficient de Jaccard's.....	54
Fig. 24: Classification hiérarchique des isolats de <i>Fusarium</i> avec les deux amorces OPF 10 et OPI 01 établie par la méthode UPGMA en utilisant le coefficient de Jaccard's.....	55

Table des matières

Introduction générale	9
-----------------------------	---

Chapitre I : Partie bibliographique

1. Synthèse bibliographique	11
1.1. Importance économique et localisation géographique de la culture de pois chiche	11
1.2. Etat sanitaire de la culture	11
2. Le flétrissement fusarien du pois chiche.....	12
2.1. Caractérisation morphologique et Taxonomie de l'agent pathogène	12
2.2. Symptômes et caractérisation pathologique du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	13
2.3. Impact économique du <i>F.o.c.</i> et répartition géographique dans le monde	14
2.4. Mode de conservation et transmission de l'agent pathogène.....	14
3. Diversité génétique et pathologique du <i>F.o.c.</i>	14
3.1. Diversité pathologique : Les races physiologiques.....	14
3.2. Diversité génétique de <i>F.o.c</i>	15
3.3. Compatibilité végétative	16
4. Méthodes de lutte	18
4.1. Pratique culturale et traitement des semences.....	18
4.2. Lutte biologique	18
4.3. Lutte génétique	19

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Matériel fongique.....	21
1.1. Collection de <i>F.o.c.</i>	21
1.2. Isolement et purification des souches	22
1.3. Production de mycélium sur milieu liquide.....	22
2. Matériel végétal.....	22
2. Etude de la compatibilité végétative	23
2.1. Sélection des mutants « Nit ».....	23

2.2. Caractérisation des mutants « nit »	23
2.3. Confrontation des mutants.....	24
3. Etudes pathologique.....	24
3.1. Préparation de l'inoculum	24
3.2. Obtention des plants de pois chiche.....	25
3.2.1. Analyse sanitaire des semences	25
3.2.2. Pré germination des graines	25
3.3. Dispositif expérimental	25
3.4. Notation et analyse des résultats.....	25
4. Caractérisation génétique par RAPD	27
4.1. Extraction de l'ADN	27
4.2. Electrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose	27
4.3. Analyse du polymorphisme des isolats par RAPD.....	28
4.3.1. Amorces utilisées.....	28
4.3.2. Conditions d'amplification	29
4.3.3. Electrophorèse	29
4.3.4. Analyse des profils.. ..	29
5. Analyses statistiques.....	30
5.1. Indice de similitude et construction de dendrogramme.....	30
5.2. Analyse en Composantes Principales (ACP)	30
5.3. Traitement des données	30

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Etude de la compatibilité végétative	32
1.1. Sélection des mutants.....	32
1.2. Caractérisation des mutants non utilisateurs de chlorate (Mutants nits)	32
1.3. Discussion	34
2. Etude pathologique.....	35
2.1. Résultats de l'inoculation artificielle	35
2.2. Discussion	45
3. Caractérisation génétique par RAPD.. ..	47
3.1. Evaluation de la pureté de l'ADN	47

3.2. Analyse des profils d'amplification de l'ADN des isolats de <i>F. o. c.</i>	49
3.3. Discussion	55

CONCLUSION GENERALE	56
---------------------------	----

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION GENERALE

Les légumineuses à graines, y compris le pois chiche (*Cicer arietinum* L.), sont de plus en plus utilisées dans les régimes alimentaires, afin de réduire les risques de maladies. Selon l'information du Centre de recherche coopérative sur les légumineuses dans l'agriculture méditerranéenne, le pois chiche est une excellente source de protéines, de fibres alimentaires, de glucides complexes, de vitamines et de minéraux. De plus, les fibres du pois chiche ont la propriété d'aider à réduire le cholestérol et à régulariser le taux de sucre dans le sang (Muehlbauer & Tullu, 1997).

Le pois chiche est surtout employé pour la consommation humaine (y compris comme légume). De petites quantités de pois chiche de qualité inférieure servent maintenant à nourrir le bétail. Une analyse nutritionnelle révèle qu'il constitue un excellent aliment pour de nombreux animaux de ferme ; la farine de pois chiche en particulier étant exempt de gluten. Les légumineuses, comme le pois chiche, ont aussi leur place dans les régimes végétariens, car elles sont une bonne source de fer et de protéines (Muehlbauer & Tullu, 1997).

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est la légumineuse à graine la plus importante dans le monde, après le haricot et la fève. Les variations de la production de pois chiche d'une année à l'autre sont dues principalement aux stress biotiques et abiotiques. En effet, les maladies sont la contrainte majeure de l'amélioration de la production, dont plus de 70 agents pathogènes ont été rapportés sur le pois chiche dans différentes régions du monde (Morjane & Harrabi, 1995).

Dans les pays du pourtour méditerranéen, les légumineuses à grosses graines sont confrontées à de nombreux problèmes phytosanitaires dont les plus dommageables sont causés par des champignons.

En Algérie, l'antracnose causée par *Ascochyta rabiei* (pass.) Lab., est la maladie la plus redoutable sur la culture de pois chiche, suivie par la fusariose causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Bouznad & al., 1998).

Ces deux pathogènes, constituent une menace pesante sur la culture de pois chiche, et sont considérés comme les plus importants facteurs limitant de la

production de pois chiche dans les différentes régions du monde (Jiménez-Gasco & al., 2004).

Différents travaux de recherche ont été développés en vue de trouver des solutions permettant de limiter les dégâts. Parmi les moyens préconisés, la lutte chimique. Cependant, les fongicides recommandés ne donnent pas toujours l'efficacité attendue. Souvent après quelques années, les produits n'ont plus aucun effet sur les pathogènes à cause de l'apparition de souches résistantes. Par ailleurs, ils ne constituent pas une solution de choix, à cause de leur effet polluant sur l'environnement, s'agissant d'un champignon du sol et de surcoût qu'ils entraînent à la production.

Les limites des méthodes de lutte prophylactiques expliquent également, les raisons pour lesquelles tous les efforts sont orientés vers la création de cultivars hautement productifs et à résistance durable.

Nos connaissances sur la variation génétique du pathogène, et surtout l'existence de races physiologiques, s'avèrent d'une grande importance dans le développement de résistance contre la fusariose. La détermination de l'hôte spécifique aux isolats, ainsi que la relation génétique entre isolats est un préalable pour la recherche des facteurs de pathogénicité, et pourraient être une base par la suite, pour le développement d'un système de détection spécifique (Roebroeck & Mes, 1992).

Le travail présenté ici, a donc pour objectif principal d'étudier par différents outils d'investigation, la variabilité phénotypique et génétique d'une collection d'isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, obtenus lors de différentes prospections dans les principales zones de culture du pois chiche en Algérie.

Cette étude est basée sur les aspects suivants :

- Etude de la compatibilité végétative des isolats.
- Test du pouvoir pathogène, par l'inoculation artificielle de six cultivars de pois chiche, dont cinq cultivars appartiennent à la gamme différentielle.
- Caractérisation génétique, par la technique RAPD.

CHAPITRE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1/ Importance économique et localisation géographique de la culture de pois chiche

Les légumineuses à grosses graines sont traditionnellement cultivées et consommées dans la région méditerranéenne ; elles constituent une composante importante du système de production céréalière. La fève et le pois chiche sont les deux espèces de légumineuses les plus cultivées dans les pays du sud de la méditerranée et particulièrement au Maghreb (Maatougui & al., 1996).

Le pois chiche *Cicer arietinum* L., troisième légumineuse alimentaire produite dans le monde, constitue une source très importante de protéines avec une teneur qui atteint 24,6% du poids du grain (Muehlbauer & Tullu, 1997).

1.2/ Etat sanitaire de la culture

La culture du pois chiche est exposée à plus de 70 pathogènes, dans les différentes régions du monde.

Dans la région méditerranéenne, plusieurs maladies fongiques sont connues, dont les plus importantes sont l'antracnose causée par *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. et la fusariose vasculaire ou « wilt » due au *Fusarium oxysporum* Schlenchtend : Fr. f. sp. *ciceris* (Padwik) Matuo & K. Sato. (Morjane & Harrabi, 1995).

Ces derniers sont responsables de la faiblesse et l'instabilité des rendements ainsi qu'en partie, du déclin de cette culture. D'autres maladies peuvent causer parfois des pertes telles que la pourriture racinaire (*Fusarium solani*), la pourriture des tiges (*Sclerotinia sclerotiorum*) et la pourriture grise (*Botrytis cinerea*) (Haware, 1990).

Comme dans le reste du pourtour méditerranéen, en Algérie l'antracnose causée par *Ascochyta rabiei* est la maladie la plus redoutable sur le pois chiche suivi du flétrissement fusarien causé par le *F. o. c.*

D'autres maladies comme les pourritures racinaires, les maladies causées par les nématodes et les viroses sont apparues récemment et sont responsables des chutes considérables des rendements (Bouznad & al., 1998).

2. LE Flétrissement fusarien de pois chiche

2.1/ Caractérisation morphologique et taxonomie de l'agent pathogène

Le genre *Fusarium* appartient à la famille des Tuberculariaceae (Fungi imperfecti) qui produisent des macroconidies pluricellulaires en forme de croissant. Les formes parfaites, quand elles sont connues se rattachent aux Hypocreaceae (sphaeriales, Ascomycetes).

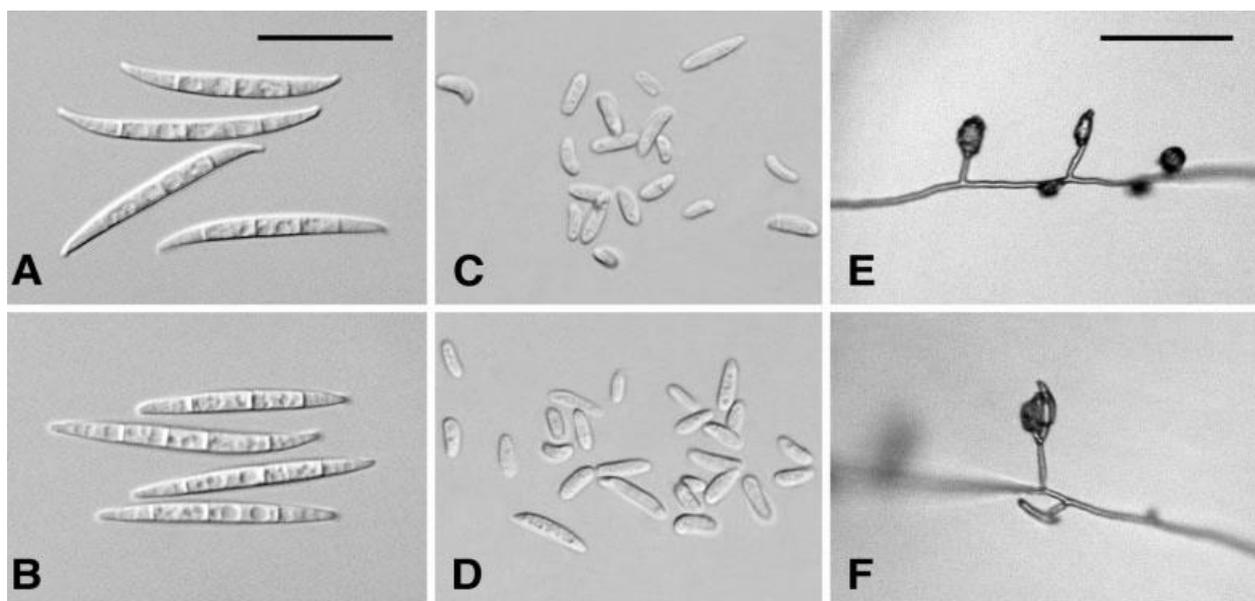
Le *Fusarium oxysporum* est répandu dans le monde entier, et est, le plus fréquent de tous les *Fusaria* du sol. Comme saprophyte actif, le *Fusarium oxysporum* joue également un rôle de premier plan en pathologie végétale ; sa virulence peut être très finement spécialisée.

Cette espèce présente une variabilité morphologique notable, même à l'intérieur d'une forme spécialisée ou d'une race, on peut observer des variations morphologique (Messiaen & Cassini, 1968).

Le *F. o. c.*, est caractérisé par des hyphes septés et abondamment ramifiés. Les microconidies naissent sur un conidiophore simple et court latéralement sur l'hyphe. Leurs formes peuvent être ovales à cylindriques et droites à courbées.

Les macroconidies sont moins nombreuses que les microconidies. Elles sont effilées aux extrémités et naissent sur des conidiophores ramifiés ; elles comportent entre 3 et 5 septations (fig. 1).

Les chlamydospores sont produites sur les cultures âgées par paire ou en chaîne terminales ou intercalaires sur le mycélium (Haware & al. 1986 ; Haware, 1990).



A – B: Macroconidies; C – D: Microconidies; E – F: Microconidies in situ on CLA (Carnation leaf agar)
(Leslie & Summerell, 2006)

Figure 1 : Aspect morphologique du *Fusarium oxysporum*

2.2/ Symptômes et caractérisation pathologique du *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*

Selon les pathotypes, deux types de symptôme peuvent apparaître : le flétrissement vasculaire causé par les races 1A, 2, 3, 4, 5 et 6 et le jaunissement foliaire causé par les races 0 et 1B/C (Trapero-casas & Jiménez-Diaz, 1985 ; Jiménez-Gasco & al., 2001).

Ces deux pathotypes du *F. o. c.*, se distinguent par la différence entre les deux syndromes où, le pathotype de jaunissement induit un jaunissement foliaire progressif avec une décoloration vasculaire. En revanche, le pathotype de flétrissement induit une chlorose sévère avec une décoloration vasculaire et un flétrissement brutal des feuilles (Perez-Artes et Tena 1989 ; Kaiser & al., 1994 ; Jiménez-Gasco & al., 2004).

Selon Haware et Nene (1980), dans les deux cas, la maladie peut apparaître à n'importe quel stade de croissance de la plante hôte. C'est pourquoi chez une variété hautement sensible, les symptômes peuvent se développer au 25^{ème} jour ou parfois bien avant, juste après la levée (Navas-cortès & al., 2000).

2.3/ Impact économique du *F. o. c.* et répartition géographique dans le monde

Le *F. o. c.* est un champignon du sol spécifiquement pathogène aux espèces de *Cicer spp.*. La maladie qu'il cause est l'un des plus importants facteurs limitant la production de pois chiche dans le monde (Jiménez-Gasco, & al, 2004). Cette maladie peut causer jusqu'à 100% de pertes de la production. Des pertes annuelles de rendement en grains de l'ordre de 10 à 15% sont enregistrées dans différents pays du monde. Cette maladie est rapportée initialement au subcontinent indien, par la suite la maladie s'est étendue au Mexique, aux Etats-Unis, en Espagne, en Turquie et en Ethiopie (Sharma & al, 2005). Le flétrissement fusarien est considéré comme la maladie la plus importante en Tunisie et au Maroc, et elle reste assez localisée en Algérie. En Tunisie, environ 40% des champs sont infestés par cette maladie (Sayoud & al., 1999). Ce champignon existe aussi au Moyen Orient, en Syrie et au Liban (Jiménez-Gasco & al, 2001).

2.4/ Mode de conservation et transmission de l'agent pathogène

Le *F. o. c.*, est un champignon du sol qui peut survivre en saprophyte pendant six ans, sous forme de chlamydospores, dans la semence et dans les débris des plantes mortes. Il survit également, sur d'autres plantes hôtes, telles que la lentille, la fève et le pois, sans montrer de symptômes extérieurs (Nene, 1980 ; Haware, 1990).

L'infection primaire est initiée par les chlamydospores ou le mycélium. L'optimum de germination des chlamydospores et de l'infection a lieu à 91% d'humidité relative et une température de 25° C. La transmission se fait principalement par la semence et l'utilisation de matériel agricole contaminé (Nene, 1980 ; Brayford, 1992 ; Haware, 1993).

3/Diversité génétique et pathologique du *F. o.c.*

3.1/ Diversité pathologique : Les races physiologiques

Sur la base de la réaction de la gamme d'hôte différentielle composée de dix cultivars (tabl. 1), le *F. o. c.* montre une variabilité pathologique, répartie en huit races physiologiques : 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 et 6 (Kapoor & al., 1992).

La sévérité de la maladie est évaluée selon une échelle de notation de 5 degrés (0 à 4). Chaque degré correspond à un pourcentage de feuilles présentant les symptômes de jaunissement ou de flétrissement (Trapero-casas & Jiménez-Diaz, 1985 ; Hervàs & al., 1995 ; Navas-cortés & al., 2000).

Le cultivar ayant une réaction de maladie moyenne inférieure à 2 et supérieure à 3 est considéré respectivement, résistant (R) et sensible (S). Quand la réaction moyenne est intermédiaire, notation comprise entre 1,5 et 2,5 ; le cultivar est considéré modérément sensible ou tolérant (M).

Par rapport aux deux types de symptômes, les races 0 et 1B/C, induisent un symptôme de jaunissement, tandis que les autres races : 1A, 2, 3, 4, 5 et 6 induisent un symptôme de flétrissement (Pérez-Artés & al., 1995 ; Jiménez-Gasco & al., 2004).

3.2/ Diversité génétique de *F. o. c.*

Le développement des techniques nouvelles de la biologie moléculaire, basées sur l'étude des acides nucléiques et la reconnaissance des séquences des nucléotides, a permis d'obtenir des connaissances plus approfondies du génome. Grâce à ces progrès, il est alors possible d'identifier chaque isolat par certaines séquences, de confectionner des sondes de diagnostic et de suivre les populations (Bouznad & al., 1998).

Pour le cas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, plusieurs techniques moléculaires ont été utilisées pour étudier la variabilité génétique des isolats. Kelly et al., (1998), a obtenu par RAPD un fragment d'ADN de 1,6 Kb, spécifique pour la race 5. Ce résultat a permis aux chercheurs de confectionner une amorce spécifique capable de détecter l'ADN de ce pathotype par PCR. De plus, deux groupes RAPD, correspondant, aux deux pathotypes, flétrissement et jaunissement, ont été clairement identifiés (Kelly & al., 1994).

Dans une autre étude, deux groupes RAPD, correspondant aux races 0 et 1B/C, et un troisième groupe RAPD correspondant aux pathotypes de flétrissement, ont été également identifiés (Jiménez-Gasco & al., 2001).

Ainsi, les différentes techniques moléculaires, telles que la PCR, la RAPD, l'AFLP, l'ISSR et la SSR, ont permis d'évaluer considérablement, la variabilité génétique au sein des isolats du *F. o. c.* (Sivaramakrishnan & al., 2002 ; Dubey & Singh, 2008 ; Bayratar & al., 2008). Cependant, l'ensemble de ces informations montre qu'à l'heure actuelle, il n'existe pas d'outils moléculaires universels permettant de distinguer chacune des races physiologiques de ce pathogène.

La RFLPs de l'ADN mitochondrial et de l'ADN total, a montré une bonne correspondance avec les groupes de compatibilité végétative de certaines formes spéciales de *Fusarium oxysporum* (Bridge & al., 1998).

3.3/ Compatibilité végétative

Aucune reproduction sexuée n'est connue chez *Fusarium oxysporum* ; pour ce champignon, seule la reproduction asexuée a permis une variation génétique, qui doit principalement résulter d'une accumulation des mutations (Jiménez-Gasco & al., 2004).

Les champignons à reproduction asexuée, comme le *Fusarium oxysporum*, utilisent l'hétérocaryose et la parasexualité comme mécanisme d'échange génétique au sein des isolats végétativement compatibles (Bridge & al., 1998).

Le terme hétérocaryose, a été introduit, pour désigner la phase durant laquelle deux ou plusieurs noyaux génétiquement différents sont présents dans le même protoplaste. Ce phénomène peut se produire par la fusion ou l'anastomose de deux hyphes de constitution génétique différente, au cours des phases sexuées ou végétatives. Les souches capables de former des hétérocaryons sexués peuvent être incapables de former des hétérocaryons végétatifs et vice-versa. Les souches capables de former ces hétérocaryons sont considérés respectivement, sexuellement ou végétativement compatibles (Leslie, 1993). Cette compatibilité végétative a été utilisée pour étudier la dynamique des populations de champignons phytopathogènes, et même les isolats non pathogènes. L'identification des groupes de compatibilité végétative a permis aussi de déterminer les origines géographiques des nouvelles races. De plus, un nombre important de groupes de compatibilité végétative est considéré comme un

indicateur de diversité génétique à l'intérieur des populations étudiées (Glass & Kuldau, 1992).

Dans la pratique, la compatibilité végétative est basée sur la formation d'un hétérocaryon prototrophe stable, par complémentation de mutants auxotrophes dans des conditions où aucun des deux mutants auxotrophes seuls ne peut se développer normalement ; les souches utilisées dans ce cas, sont des mutants affectés dans la voie d'assimilation du nitrate. La compatibilité ou l'incompatibilité végétative entre deux souches est mise en évidence par confrontation des mutants « nit » sélectionnés à partir de chaque souche. Si les deux souches sont végétativement compatibles, leur confrontation, conduit à la formation d'hétérocaryon qui se traduit par la formation d'une bande de mycélium aérien dense aux zones de rencontre des deux thalles mutants. Si les deux souches sont végétativement incompatibles, il n'y aura pas formation d'hétérocaryon (Puhalla, 1985).

En particulier, l'application de la compatibilité végétative, à l'analyse de la diversité génétique chez le *Fusarium oxysporum*, a mis en évidence une relation étroite entre groupes de compatibilité végétatives et formes spéciales chez le *Fusarium oxysporum* (Puhalla, 1985). De même, Ahn et al., (1998), ont obtenu des résultats qui confirment la relation entre les groupes de compatibilité végétative et l'agressivité des isolats de *Fusarium* provoquant le flétrissement du concombre.

Toutefois, des études ont montré, qu'il n'existe pas de relation directe entre les groupes de compatibilité végétative et les races physiologiques. Ainsi, les isolats d'une même race, peuvent se répartir dans plusieurs groupes de compatibilité végétative et/ou des isolats de races différentes peuvent se regrouper dans un même groupe de compatibilité végétative (Roebroek & Mes, 1992 ; Katan & al., 1994 ; Elena & Pappas, 2006). En revanche, tous les isolats de certaines formes spéciales peuvent appartenir à un seul groupe de compatibilité végétative. Ce type de corrélation a été montré pour des isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, (Nogales-Moncada et al., 1993 in Katan, 1999), pour des isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Ouinten, 1996), et pour des isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (Elena & Pappas, 2002).

4/ Méthodes de lutte

4.1/ Pratiques culturales et traitement de semences

La date de semis tel le semis précoce en début d'hiver sous climat méditerranéen, peut ralentir le développement du champignon (Navas-Cortes & al., 2000).

En tout état de cause, la rotation culturale ne peut être adoptée pour éradiquer la maladie vu que le champignon peut survivre dans le sol pour une longue durée (Haware, 1990).

En revanche, l'utilisation de produits chimiques reste toujours utile pour limiter l'infection. Ainsi, le trempage des semences dans différents fongicides (captafol, thirame, benomyl, thiophanate de méthyle et le manèbe), est utilisé pour contrôler la maladie (Brayford, 1992).

Comme méthode physique, La solarisation peut induire une réduction significative de l'indice de la maladie. L'effet de cette technique est proportionnel à la température accumulée au cours de la solarisation (Arora & Pandey, 1989).

4.2/ Lutte biologique

L'utilisation abusive des produits chimiques à travers le monde, a montré leur limite sur le plan efficacité et environnemental. A cet effet, la lutte biologique contre le flétrissement fusarien du pois chiche par l'utilisation d'agents biologiques, devient une méthode de lutte prometteuse. Plusieurs types de micro-organismes capables de limiter la gravité des fusarioses, ont été isolés : *Trichoderma* spp. (Sivan & Chet, 1986), *Pseudomonas* spp. (Scher & Baker, 1982), et autres souches non pathogènes du genre *Fusarium* (Alabouvette & al., 1987).

L'efficacité des espèces de *Trichoderma* a été améliorée par combinaison avec le produit carboxin. Lors d'essais expérimentaux, l'utilisation combinée de *Trichoderma harzianum* (10^6 spores/ml/10 g de semence) avec la carboxine (2g / Kg de semence), pour le traitement de semences a augmenté le taux de germination d'environ 12 à 14%, a réduit l'incidence du flétrissement de 60,3% à 44,1%, et une augmentation de rendement en graine de 42,6 à 72,9%, durant l'expérimentation (Dubey & al, 2007).

Cependant, ces travaux consacrés à cette méthode de lutte se sont limités à la mise en évidence des capacités antagonistes de ces micro-organismes et rapportent des résultats de lutte biologique obtenus dans des conditions expérimentales éloignées de la pratique culturale.

4.3/ Lutte génétique

L'utilisation de la résistance variétale est la méthode la plus efficace dans la lutte contre une maladie. De ce fait, cette résistance devient un caractère particulièrement recherché chez le genre *Cicer* (Morjane & Harrabi, 1995).

Malheureusement, l'efficacité de cette résistance se trouve limitée par la variabilité pathologique du champignon (Jiménez-Gasco & al., 2004).

Plusieurs travaux qui visent à identifier des gènes de résistance aux différentes races physiologiques de *F.o.c.*, ont été menés. Ainsi, il a été montré que la résistance vis-à-vis de la race 4 est contrôlée par deux gènes (Tullu & al., 1999), tandis que la résistance vis-à-vis de la race 3 est mono génique (Sharma & al., 2004). La résistance vis-à-vis de la race 2 quant à elle, est contrôlée par trois gènes indépendants (Gumber & al., 1995 in : Sharma & Muehlbauer, 2007). Enfin, la résistance à la race 0 est contrôlée par deux gènes (Rubio & al., 2003) (tab. 2).

Tableau 1: Gènes de résistance vis-à-vis des différentes races de *F. o. c.*

Races de <i>F.o.c.</i>	Noms des gènes de résistance	Effet des gènes de résistance
0	<i>F.o.c.</i> -0 ₁ / <i>F.o.c.</i> -0 ₁ ' <i>F.o.c.</i> -0 ₂ / <i>F.o.c.</i> -0 ₂ ' ^a	Résistance complète ^b
1A	h ₁ (syn <i>F.o.c.</i> -1), h ₂ H ₃	Flétrissement retardé Flétrissement retardé Flétrissement retardé
1B/c	-	
2	<i>F.o.c.</i> -2 ^{abc}	Résistance complète
3	<i>F.o.c.</i> -3/ <i>F.o.c.</i> -3 ^a	Résistance complète
4	<i>F.o.c.</i> -4 deux gènes récessifs	Résistance complète ^b
5	(<i>F.o.c.</i> -5/ <i>F.o.c.</i> -5) ^a	Résistance complète
6	-	

^a caractère dominant/récessif non connu

^b Effet du gène individuel dans la résistance non connu

^{abc} gouverné par 3 gènes : a, b et c

(-), génétique de résistance non connu

(Sharma & Muehlbauer, 2007)

CHAPITRE II

**MATERIEL
ET
METHODES**

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1/ Matériel fongique

1.1/ Collection de *F.o.c*

Quatorze isolats de *Fusarium* ont fait l'objet de notre étude. Au début de ce travail, nous disposions de 9 isolats de *F.o.c.* : 6 isolats provenaient de la collection du laboratoire de mycologie (INA El-Harrach) isolés à partir de différents organes des plants de pois chiche infectés.

La collection est complétée par un isolement à partir de 2 échantillons de pois chiche de 2004 présentant le syndrome de flétrissement. Ces échantillons provenaient de l'ITGC de SETIF, et l'ITGC d'El-Harrach.

D'autres isolats sont utilisés dans la présente étude, il s'agit d'isolats que nous avons nous-mêmes isolés à partir de 3 plantes présentant un jaunissement à savoir, le petit pois (*Fusarium oxysporum spp*), haricot (*Fusarium solani*) et blé dur (*Fusarium graminearum*) ; (tabl. 3).

Tableau 2 : Collection et origine des isolats de *Fusarium*

Isolats	Origine géographique	Date d'isolement	Organe d'isolement
O-93	Oued Smar	1993	Tige
O-04/02	Oued Smar	Avril 2002	Tige
O-10/02	Oued Smar	Octobre 2002	Tige
O-10/01	Oued Smar	Octobre 2001	Tige
S-93	Sidi Bel Abbas	1993	Tige
K-93	Khroube	1993	Tige
G-93	Guelma	1993	Tige
E-00	Espagne	1993	Tige
I-99	Ina	1999	Tige
SS-03	Sétif	2003	Semences
IT-03	ITGC	2003	Tige
FH	ITCMI	2004	Tige de l'haricot
Fpp	ITGC	2004	Tige de petit pois
Fb	ITGC	2004	Feuille de blé dur

1.2/ Isolement et purification des souches

L'obtention des isolats à partir des différents organes a été réalisée par désinfection de petits morceaux d'organes malades à l'hypochlorite de sodium à 2% pendant 5 minutes, puis rincés à l'eau distillée stérilisée, séchés au papier buvard puis déposés sur le milieu PDA (Annexe 1).

Après 4 à 5 jours d'incubation à 25° C sous lumière NUV (proche ultra violet) en continue, des filaments mycéliens se développent et forment un thalle de morphologie particulière. L'observation microscopique d'un prélèvement effectué à partir d'une culture de quelques jours, permet de vérifier l'appartenance des isolats au genre *Fusarium*.

La purification est réalisée par des repiquages successifs, à partir d'explants de cultures ne présentant aucune contamination et choisi au niveau de la zone de croissance des colonies. Les isolements ont fait l'objet d'une culture monospore, et conservés en tube à essai sur milieu PDA.

1.3/ Production de mycélium en milieu liquide

Des flacons de 250 ml, contenant 50 ml de milieu liquide à base de pomme de terre et de glucose (Annexe 1), sont ensemencés par 5 explantats de *F.o.c* de 8 mm de diamètre, prélevés sur une culture jeune de 7 jours, sur milieu PDA.

Après 7 jours d'incubation en agitation continue à 25°C ; le mycélium est récupéré par filtration sur tissu (tulle), lavé à l'eau distillée stérilisée, séché avec du papier buvard stérilisé et stocké à -20°C jusqu'à utilisation pour l'extraction de l'ADN.

2/ Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de cinq cultivars sur les dix que comporte la gamme d'hôte différentielle : JG-62 , JG-74 , WR-315 , BG-212 , CPS-1 , ; complété par le cultivar ILC-3279 qui est considéré comme un témoin sensible.

Les six cultivars nous ont été fournis gracieusement par l'ITGC de Oued Smar

2. Etude de la compatibilité végétative

2.1/ Sélection des mutants « Nit »

Cette technique consiste, à sélectionner des mutants spontanés ou mutant « nit » par repiquage de fragments mycéliens de *Fusarium*, sur un milieu à base de chlorate (MMC) à 30g/l (Annexe 2), prélevées à partir de culture sur milieu PDA. Pour chaque souche, on dépose 24 explants, à raison de 8 explants par boîte, à environ 2 cm l'un de l'autre. Les explants sont prélevés à partir de cultures fongiques âgées de 7 jours se développant sur milieu PDA. La sélection des boutures mycéliennes résistantes au chlorate aura lieu après 10 jours d'incubation à 25°C. Les mutants « nit » ainsi sélectionnés feront l'objet d'une caractérisation (Puhalla, 1985).

2.2/ Caractérisation des mutants « nit »

L'objectif de cette étape est de déterminer le type de mutant, « nit 1 », « nit 3 » ou « nit M », auquel appartiennent les mutants obtenus sur le milieu MMC. Trois sources d'azote sont utilisées, à savoir le nitrate, le nitrite et l'hypoxanthine.

Tous les mutants sélectionnés sont mis en culture sur le milieu minimum MM (Annexe 2), où la seule source d'azote est le nitrate. Les mutants présentant un thalle rasant, sans mycélium aérien, sont ensuite mis en culture sur deux milieux de culture contenant chacun du nitrite ou de l'hypoxanthine comme source d'azote (Annexe 2).

Les géotypes des mutants « nit 1 », « nit 3 » ou « nit M », sont déterminés grâce à la morphologie du mycélium sur les trois milieux de culture utilisés, (tabl. 4).

Tableau 3 : Identification des mutants non utilisateurs du nitrate par leur croissance sur trois sources d'azote

Désignation du mutant	Croissance sur les différentes sources d'azote		
	Na No ₃	Na No ₂	HPX
nit 1	-	+	+
nit 3	-	-	+
nit M	-	+	-

HPX :Hypoxantine

+ : Mycélium de type sauvage

- : Mycélium ras, sans filament aérien (Correll & al., 1987)

2.3/ Confrontation des mutants

Pour vérifier la compatibilité ou l'incompatibilité entre les différents mutants obtenus, des explants mycéliens sont prélevés de chaque mutant que l'on dépose à 2 cm, l'un de l'autre dans les différentes combinaisons possibles, dans une boîte de Pétri contenant du milieu minimum MM.

Contrairement à l'incompatibilité végétative qui se traduit par l'interpénétration des hyphes des deux mutants sans modification apparente de la morphologie du thalle, la compatibilité végétative se traduit par la formation d'une bande de mycélium aérien dense aux zones de rencontre des deux thalles mutants, après 8 jours d'incubation à 25°C.

Au cours de cette étape, nous avons d'abord testé l'auto compatibilité, par la confrontation des « nit 1 » et des « nit M » de la même souche. Seuls les mutants auto-compatibles ont été retenus pour la suite de cette étude.

3. Etude pathologique

3.1/ Préparation de l'inoculum

L'inoculum de tous les isolats a été préparé selon la méthode décrite par Trapero-Casas et Jiménez-Diaz (1985) ; Gupta et al. (1986) et Kaiser et al. (1994). Dans des sacs de 3 kg, en plastic contenant du sable tamisé, est ajouté de la farine de maïs humidifié par l'eau distillée, selon les proportions respectivement de 9/1/2. Le mélange est stérilisé à l'autoclave pendant 20 min à 120°C, puisensemencé par 50 explantats de 8 mm de diamètre prélevés à partir de cultures de *F.o.c* âgées de 15 jours. L'incubation est réalisée pendant 15 jours en salle de culture. Une agitation des sacs tous les 3 jours est effectuée afin de permettre une colonisation homogène du milieu par le champignon. L'inoculum ainsi obtenu est incorporé dans des pots contenant le substrat de culture stérilisé, à raison de 100 g d'inoculum pour 1 Kg de substrat. Ce dernier, est composé d'un mélange stérile de sable, terre et terreau, selon les proportions respectivement de 1/1/1. Le semis est réalisé 15 jours après l'incorporation de l'inoculum au substrat, afin de permettre une meilleure colonisation par le champignon.

3.2/ Obtention des plants de pois chiche

3.2.1/ Analyse sanitaire des semences

L'état sanitaire des semences est vérifiée par la méthode du papier buvard ou « blotter test » décrite par Neergaard (1979). Cette méthode consiste à désinfecter préalablement les semences à l'hypochlorite de sodium à 2 % pendant 5 minutes, puis les rincer à l'eau distillée stérile et les déposer dans des boîtes de Pétri avec un substrat humidifié constitué par du papier buvard stérilisé.

Les boîtes sont incubées à 22°C pendant 7 jours, période suffisante à la croissance du champignon, lorsqu'il est présent.

3.2.2/ Prégermination des graines

Les semences de pois chiche ont été désinfectées par trempage dans de l'hypochlorite de sodium à 5% pendant 2 minutes puis, rincées à l'eau distillée stérile. Après 5 jours d'incubation, les semences pré germées ont été transplantées dans des pots, à raison de 7 plants / pot, contenant le substrat de culture déjà inoculé, et maintenues sous serre pendant 2 mois.

3.3/ Dispositif expérimental

Le semis est réalisé en serre dans des pots. Chaque pot renferme 7 graines du même cultivar germées, et inoculées avec un même isolat. Les témoins sont constitués par 6 pots contenant chacun 7 plants représentant les répétitions d'un même cultivar, semés sur un substrat similaire mais non inoculés.

Le dispositif expérimental retenu est un dispositif factoriel à 2 facteurs en randomisation totale.

3.4/ Notations et analyse des résultats

Des observations hebdomadaires sont effectuées, et les notations interviennent 20, 40 et 60 jour après le semis.

La sévérité de la maladie est évaluée selon une échelle de notation de 5 degrés (0 à 4). Chaque degré correspond à un pourcentage de feuilles présentant les

symptômes de jaunissement ou de flétrissement (Trapero-casas & Jiménez-Diaz, 1985 ; Hervàs & al., 1995 ; Navas-cortés & al., 2000).

Tableau 4 : Echelle de notation pour la fusariose du pois chiche

Degrés d'attaque	Pourcentage de feuilles atteintes
0	0% de feuilles jaunies ou flétries
1	1-33% de feuilles jaunies ou flétries
2	34-66% de feuilles jaunies ou flétries
3	67-100% de feuilles jaunies ou flétries
4	100 % Plantes mortes

Après notation, les plantules sont soigneusement déterrées, et un ré-isolément est effectué afin de confirmer la présence des isolats de *F.o.c.* En fin d'expérimentation, les plantules infectées sont détruites par le feu, et le substrat est arrosé par l'hypochlorite de sodium à 20%.

La réaction moyenne globale est évaluée par le rapport :

$$IM = (0 f_0 + 1 f_1 + 2 f_2 + 3 f_3 + 4 f_4) / N$$

IM : indice de la maladie

F : nombre de plants pour chaque degré de l'échelle de notation

N : nombre total de plants utilisés

Tableau 5 : Réaction différentielle des dix cultivars de pois chiche vis-à-vis des différentes races physiologiques de *F.o.c.*

Race physiologique	0	1A	1B/C	2	3	4	5	6
Cultivars de pois chiche								
12-071/10054	S	M	S	R	R	R	R	R
JG-62	R	S	S	S	S	S	S	S
C-104	M	M	R/M	S	S	S	S	M
JG-74	R	R	R	S	R	R	M	R
CPS-1	R	R	R	S	M	M	M	R
BG-212	R	R	R	S	M	M	R	R
WR-315	R	R	R	R	S	R	R	R
ICCV-2	R	R	R	M	M	M	S	M
ICCV-4	R	R	R	S	S	S	S	M
P-2245	S	S	S	S	S	S	S	S

S : Sensible, M (Tolérante) : modérément sensible, R : Résistante

(Pérez-Artés & al., 1995 ; Jiménez-Gasco & al., 2004)

Les cultivars ayant une réaction de maladie moyenne inférieure à 1,5 ou supérieure à 2,5, sont considérés respectivement, comme résistants (R) ou sensibles (S). Quand la réaction moyenne est intermédiaire, ce cultivar est considéré modérément sensible ou tolérant (M).

4. Caractérisation génétique par RAPD

4.1/ Extraction de l'ADN

L'ADN total des isolats est extrait selon la méthode décrite par Weigand et al. (1993). A cet effet, 4 g de mycélium frais sont broyés en présence d'azote liquide, jusqu'à obtention d'une poudre fine. Le broyat est récupéré dans des godets (15 ml) auxquels on rajoute 10 ml de tampon d'extraction à base de CTAB X 1 (Annexe 3) préchauffé à 60°C. Après homogénéisation du mélange et incubation à 65°C pendant 30 min pour bien réhydrater le broyat, on rajoute 10 ml de chloroforme /alcool isoamilique (24/1) afin de dénaturer les protéines. Le mélange est mis en agitation rotative pendant 10 min pour obtenir une émulsion. Les godets sont centrifugés à 4000 Tr/mn pendant 15 minutes. Ensuite le surnageant, estimé à 400 µl par tube, est transféré dans de nouveaux tubes, auquel on rajoute 2/3 du volume de l'isopropanol froid (- 20°C) ; après 30 min d'incubation à 4°C, les acides nucléiques sont précipités. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 4000Tr/mn, et le surnageant est éliminé et le culot est rincé trois fois avec le tampon de lavage, puis égoutté sur du papier buvard, et séché sous la hotte. L'extrait d'ADN est dissout dans 100 µl de TE (Annexe 3) puis stocké pendant une nuit à 4°C.

4.2/ Electrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose

L'extrait d'ADN obtenu est analysé par électrophorèse en mélangeant 5 µl d'ADN et 5 µl de tampon de charge (Loading buffer) et déposés dans les puits. La migration est effectuée sur un gel d'agarose à 1% (Annexe 3), sous une tension de 95 volts pendant 30 minutes. Une fois la migration achevée, le gel est plongé dans une solution de bromure d'éthidium (BET) à une concentration de 0.5 µg/ml pendant 30 min, puis posé sur un trans illuminateur émettant une lumière ultraviolette qui permet de visualiser les bandes d'ADN. Ces dernières sont photographiées à l'aide d'un appareil photographique numérique. L'évaluation de la qualité et la concentration de l'ADN est complétée par un dosage spectrophotométrique, aux longueurs d'ondes 260nm et 280 nm. La formule permettant de calculer la concentration de l'ADN est la suivante :

$$\text{ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{DO } 260 \times 100(\text{facteur de dilution}) \times 50\mu\text{g}/\text{ml} \times 10^{-3}$$

100 : facteur de dilution \implies 10 μl pour 990 μl de T.E.

1 μg d'ADN/ ml correspond à 50% ADN et 50% ARN

La qualité de l'ADN est mesurée par l'indice de pureté qui correspond au rapport de la valeur lue à la longueur d'ondes de 260 nm (absorbance de l'ADN) sur la valeur lue à la longueur d'ondes de 280 (absorbance des protéines). Cet indice de pureté doit être voisin de 1,8 - 2 (Weigand & al., 1993).

4.3/ Analyse du polymorphisme des isolats par RAPD

Le principe de la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) consiste à réaliser une série successive d'amplification in vitro en présence d'une ADN polymérase (Taq polymérase) et d'une amorce synthétique aléatoire courte. Cette séquence aléatoire de synthèse est constituée en général d'une dizaine de paires de bases de longueur.

L'amorce s'hybride à chaque fois qu'elle rencontre une séquence qui lui est complémentaire sur la chaîne cibles de l'ADN. Si deux sites d'hybridation sont proches l'un de l'autre (à moins de 3000 pb), et en directions opposées, l'amplification aura lieu. Si un de ces deux sites est absent, il n'y aura pas d'amplification et un polymorphisme de présence/ absence sera observé (Santoni & al., 2000).

4.3.1/ Amorces utilisées

Au cours de cette analyse, nous avons retenu les deux amorces OPERON (OPF-10, OPI-01), sont sélectionnées selon une analyse de polymorphisme de 99 isolats de *F.o.c.*, réalisée par Jiménez-Gasco et al (2001) ; les séquences sont :

OPF-10 : 5'-G G A A G C T T G G-3'

OPI-01 : 5'-A C C T G G A C A C-3'

Selon les travaux de Jiménez-Gasco et al (2001), l'amorce OPF-10 amplifie préférentiellement les races 1 B/C,4 et 5 alors que l'amorce OPI-01 est plutôt spécifique pour les races 0, 1 A, 1 B/C et 6 de *F.o.c.*

4.3.2/ Conditions d'amplification

L'amplification de l'ADN a été réalisée dans un milieu réactionnel dont la composition est donnée ci-dessous :

Amorce	0,5 μ M (1,25 μ l)
dNTP,	200 μ M de chaque nucléotide (0,5 μ l x 4)
Tampon spécifique 10 x	2,5 μ l
MgCl ₂	1,5 mM (02 μ l)
ADN fongique avec	50 ng (02 μ l)
Taq ADN polymérase	02 unités (02 μ l)
H ₂ O ultra pure q.s.p.	25 μ l

L'amplification proprement dite est réalisée dans un thermocycleur de type PTC 100 (Peltier Thermal Cyler) selon le programme suivant :

1. Une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 4 min.
2. 30 cycles constitués de 3 étapes chacun : 1 min de dénaturation à 94°C suivie de 1 min d'hybridation à 37°C, et 3 min d'élongation à 72°C.
3. Le cycle final consiste en 6 min à 72°C pour finir l'élongation des séquences en voie de synthèse.

(Jiménez-Gasco & al., 2001).

4.3.3/ Electrophorèse

La séparation des séquences amplifiées par RAPD est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,4%.

5 μ l du produit d'amplification mélangé à 5 μ l de tampon de charge, sont déposés dans le gel. La migration est effectuée dans du tampon TAE x1 (Annexe 3) à 50 v pendant 10 min, suivie de 1h 30 min à 95v. Le gel est ensuite plongé dans une solution de bromure d'éthidium (BET) à une concentration de 0.5 μ g/ml pendant 30 min. Après coloration, les profils ainsi obtenus sont visualisés sous UV à l'aide d'un trans-illuminateur et photographiés à l'aide d'un appareil photo numérique.

4.3.4/ Analyse des profils

Les profils obtenus sont analysés par estimation des présences absences des bandes. Ces dernières sont dénombrées et leur présence ou absence est notée dans une matrice selon un système binaire 0-1. Une analyse permettant de traiter les données de façon qualitative et quantitative a été effectuée.

5. Analyses statistiques

5.1/ Indice de similitude et construction de dendrogramme

Le résultat préliminaire d'une analyse numérique des profils phénotypiques, est la construction d'une matrice basée sur une formule permettant le calcul d'un coefficient de similitude entre les souches à classer ; ce coefficient est appelé « indice de similitude ». Le plus couramment utilisé en biologie est l'indice de Jaccard dont la formule est : $Jc_{ji} = A/(A+B+C)$

Tel que:

		Echantillon j	
		Présence	Absence
Echantillon i	Présence	A	B
	Absence	C	D

Indice de similitude est utilisé pour la construction de dendrogramme. Ce dernier n'est qu'une représentation graphique de la matrice, qui permet une visualisation simple pour une interprétation aisée des résultats obtenus.

5.2/ Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'ACP est basée sur l'étude d'une grandeur statistique appelée inertie, ou bien sur l'étude de la covariance des variables. L'ACP a pour principe la maximalisation de la variance ou de la covariance d'une variable. Le critère choisi est celui de la dispersion.

L'analyse en composantes principales qui intervient dans l'analyse descriptive, s'intéresse à la structure de la matrice d'observation, elle est basée essentiellement sur une présentation graphique des résultats. Cette représentation nous permettra de visualiser certains problèmes non décelables à l'état brut (Dechemi & al., 1997).

L'intérêt de l'ACP, est la dispersion des individus dans un plan et leur corrélation à un système d'axes corrélés avec les variables. Cette dispersion est déterminée par les axes qui prennent en compte la contribution de chaque variable. Ces axes caractérisés par un taux d'inertie, sont les axes factoriels qui permettent de représenter au mieux les points du nuage.

5.3/ Traitement des données

Nous avons utilisé : le logiciel **M.V.S.P.** (**M**ulti-**V**ariate **S**tatistical **P**ackage) version 3.12 de Kovach Computing Services, pour les analyses en composante principale et les dendrogrammes, et le logiciel Excel pour l'analyse de la variance.

CHAPITRE III

**RESULTATS
ET
DISCUSSION**

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. ETUDE DE LA COMPATIBILITE VEGETATIVE

1.1/ Sélection des mutants

La sélection des mutants spontanés est réalisée sur un milieu de sélection à base de chlorate MMC. De ce fait, un isolat qui se développe sur le milieu à base de chlorate, est appelé un mutant chlorate résistant ou mutant « nit ». De façon générale, nous avons obtenu entre 2 et 5 mutants « nit » pour chaque isolat testé.

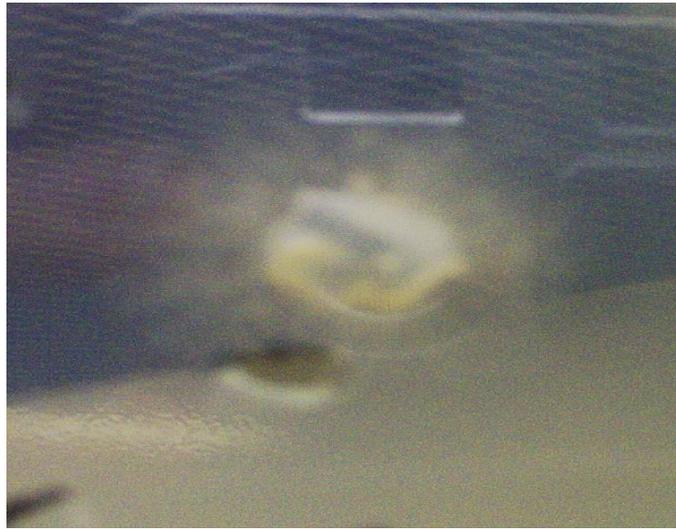
1.2/ Caractérisation des mutants non utilisateurs de chlorate (mutants nits)

Les types de chaque mutant non utilisateurs de nitrates sélectionnés sur milieu MMC, à base de nitrate, de nitrite et d'hypoxanthine, nous a permis de distinguer seulement trois isolats SS-03, O-10/02 et O-10/01, qui présentent 1 « Nit M » pour SS-03, 1 « Nit M » pour O-10/02 et 6 « Nit M » pour O-10/01, (fig. 10). Seul l'isolat G-93 présente 2 « nit 3 », par contre, les isolats FH, E-00, FB, IT-03 et O-04/02 ne présentent que des « nit 1 » ; aucun mutant n'a été obtenu avec les 5 autres isolats (tabl. 6).

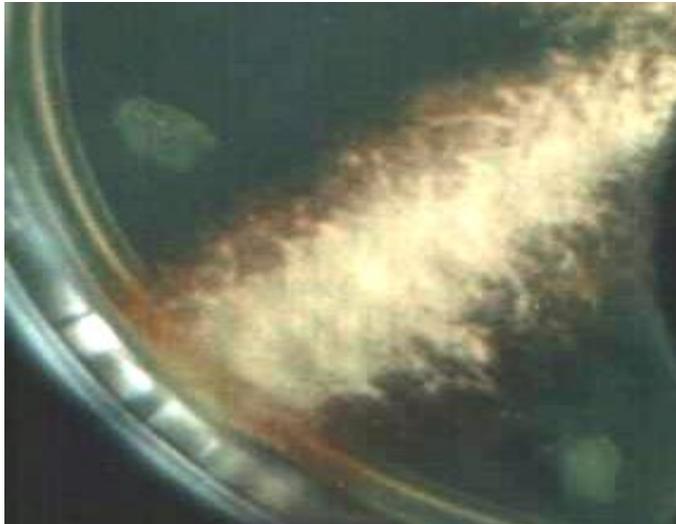
Tableau 6 : Type et nombre de mutants caractérisés par les trois sources d'azote (nitrate, nitrite et hypoxanthine)

Type de mutant	nit 1	nit 3	Nit M
Isolats			
Fh	3	0	0
E-00	3	0	0
SS-03	1	0	1
O-10/02	2	0	1
Fb	2	0	0
G-93	1	2	0
IT-03	1	0	0
O-04/02	1	0	0
O-10/01	0	0	6
Fp	0	0	0
K-93	0	0	0
SS-03	0	0	0
I-99	0	0	0
O-93	0	0	0

La confrontation des mutants complémentaires « nit 1 » et « Nit M », a permis une auto-compatibilité uniquement pour l'isolat O-10/02, qui s'est traduite par la formation d'un mycélium aérien plus ou moins dense dans la zone de rencontre des thalles (fig. 2). Les autres isolats n'ont montré aucune compatibilité, ce qui signifie qu'aucun groupe de compatibilité végétative n'est mis en évidence.



a



b

Figure 2 : (a) Morphologie d'un mutant « nit » sur le milieu MM (b) Réaction de complémentarité positive d'auto-compatibilité chez l'isolat O-10/02

1.3/ Discussion

L'étude de la compatibilité végétative des isolats, nous a permis d'obtenir des mutants « nit », et de caractériser des mutants non utilisateurs de chlorate, par l'utilisation des milieux nitrate, nitrite et hypoxanthine. Cependant, la confrontation de ces mutants n'a abouti à l'auto compatibilité que pour un seul isolat. Par conséquent, ces résultats ne permettent pas d'établir des groupes de compatibilité végétative.

Cela, est due peut être à des erreurs durant les manipulations d'une part, et l'utilisation d'un nombre d'isolats très réduit, d'autre part. Sachant que ce genre d'étude nécessite un plus grand nombre d'isolats, pour avoir un maximum de mutant « nit ».

Cette approche d'étude pourrait servir ultérieurement, à des études de la diversité génétique du *F.o.c.*, car cette méthode a montré son intérêt par ailleurs, pour des études de la variabilité génétique et pathologique des champignons phytopathogènes (Puhalla, 1984 ; Ahn & al, 1998 ; Goud & Termorshuizen, 2002).

2. ETUDE PATHOLOGIQUE

2.1. Résultats de l'inoculation artificielle

La maladie évaluée selon une échelle de notation à 5 degrés (0-4), durant 3 périodes 20, 40 et 60 jours après le semis, montre des indices de maladie en évolution progressive (Annexe 4).

Ainsi le jaunissement est le premier symptôme manifesté 17 jours après inoculation du cultivar JG-74, par l'isolat O-93. Trois jours plus tard, les autres cultivars inoculés par les autres isolats ont montré le même symptôme avec un indice d'attaque comparable, mais inférieur à 1 pour la majorité (fig. 4, 5 et 6). Au 40^{ème} jour, le symptôme de jaunissement est généralisé chez toutes les combinaisons isolat/cultivar, mais avec des indices d'attaque variant de 1 à 3. Après 60 jours d'inoculation, le cultivar JG-74 inoculé par K-93 et O-10/02, ILC-3272 inoculé par O-10/01 et O-10/02, BG-212 inoculé par G-93, et CPS-1 inoculé par I-99 et O-10/02 ont présenté un symptôme typique de flétrissement (fig. 7, 8).

Généralement, les symptômes causés par les isolats O-93, S-93, E-00, O-04/02, SS-03 et IT-03 commencent par un jaunissement progressif accompagné d'une chute de folioles desséchées. Alors qu'un flétrissement apparaît au 55^{ème} jour, causé par les isolats O-10/02, O-10/01, K-93, G-93 et I-99, les plus agressifs dans notre cas. L'apparition de symptômes typiques au *F.o.c.* exprimés par un jaunissement et/ou un flétrissement, ainsi que le développement progressif de la maladie tel qu'il est décrit par Trapero-casas & Jiménez-Diaz, 1985 ; Jiménez-Gasco & al., 2001, confirment l'appartenance des isolats étudiés à l'espèce *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.



Figure3: Vue générale du dispositif expérimental aléatoire



Figure 4: Symptôme de jaunissement observé sur le cultivar ILC-3279 par l'isolat G-93, 55 jours après l'inoculation



Figure 5 : A gauche, jaunissement observé sur le cultivar BG-212 par l'isolat E-00, 55 jours après l'inoculation, Témoin à droite



Figure 6 : Jaunissement observé sur le cultivar JG-62 par l'isolat SS-03, 55 jours après l'inoculation, Témoin à gauche



Figure 7 : Symptôme de flétrissement observé sur le cultivar JG-74 par l'isolat K-93, 55 jours après l'inoculation



Figure 8 : Symptôme de flétrissement observé sur le cultivar CPS-1 par l'isolat O-10/02, 55 jours après l'inoculation

La lecture des résultats au 60^{ème} jour après le semis, montre que la variété ILC-3279 est le cultivar le plus sensible parmi les 6 génotypes testés, tandis que le cultivar BG-212 s'est comporté comme le plus résistant. La plupart des autres cultivars ont montré un comportement de tolérance.

En ce qui concerne le comportement pathologique des isolats, ces derniers ont provoqué des symptômes de jaunissement et/ou de flétrissement sur tous les cultivars. Cependant, le degré d'attaque et le type de symptôme diffèrent d'un isolat à un autre. En effet l'isolat O-10/02, le plus virulent sur la plupart des cultivars, a induit les deux symptômes : jaunissement sur les cultivars JG-62, WR-315 et BG-212, et flétrissement sur les cultivars JG-74, CPS-1 et ILC-3279.

Les autres isolats ont provoqué également un symptôme de flétrissement à savoir les isolats, K-93, I-99, G-93, et l'isolat O-10/01 sur les cultivars J-G-74, CPS-1, BG-212 et ILC-3279. Parmi les 11 isolats testés O-04/02 et S-93 ont été les moins virulents avec un degré d'attaque toujours inférieure à 2, quelque soit le cultivar.

Le type de réaction des différents cultivars à l'égard des isolats testés, permet de constater un comportement différentiel des cultivars (tabl. 7).

Tableau 7 : Réactions des différents cultivars vis-à-vis des différents isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*

Cultivars	JG-62	JG-74	WR-315	CPS-1	BG-212	ILC-3279
Isolats						
O-93	M	M	R	M	R	S
S-93	R	M	R	M	R	M
K-93	M	S	M	M	M	S
I-99	M	M	M	M	M	S
G-93	S	M	S	M	M	S
E-00	M	M	R	R	R	M
O-10/01	R	M	M	R	R	S
O-04/02	R	R	M	R	R	R
O-10/02	S	S	S	S	M	S
SS-03	M	M	R	R	R	S
IT-03	R	M	R	M	R	M
Témoin	R	R	R	R	R	R

S : Sensible, M (Tolérante) : modérément sensible, R : Résistante

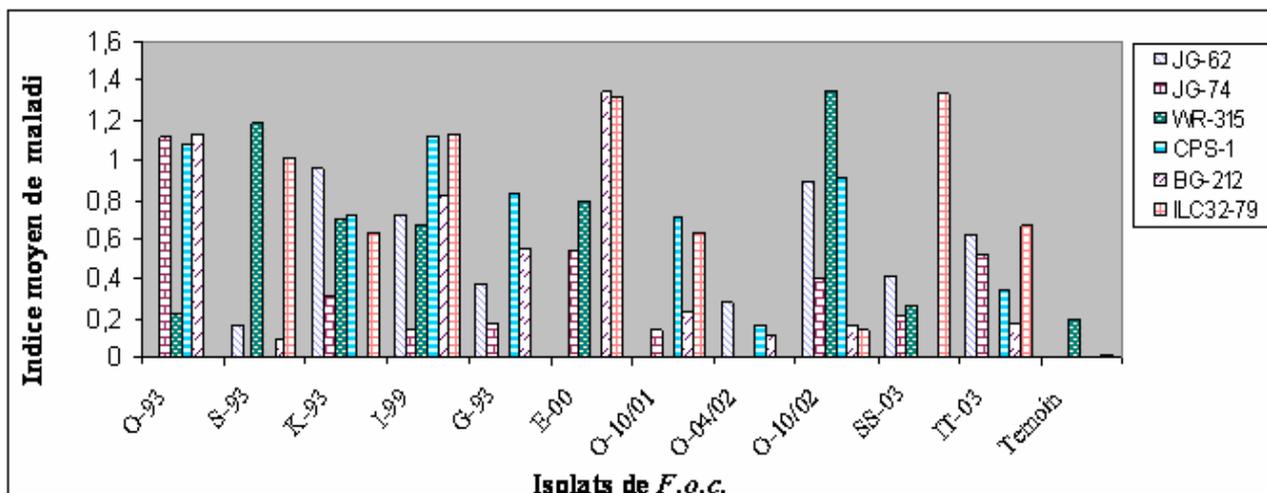


Figure 9: Représentation graphique de l'indice moyen de maladie au 20e j

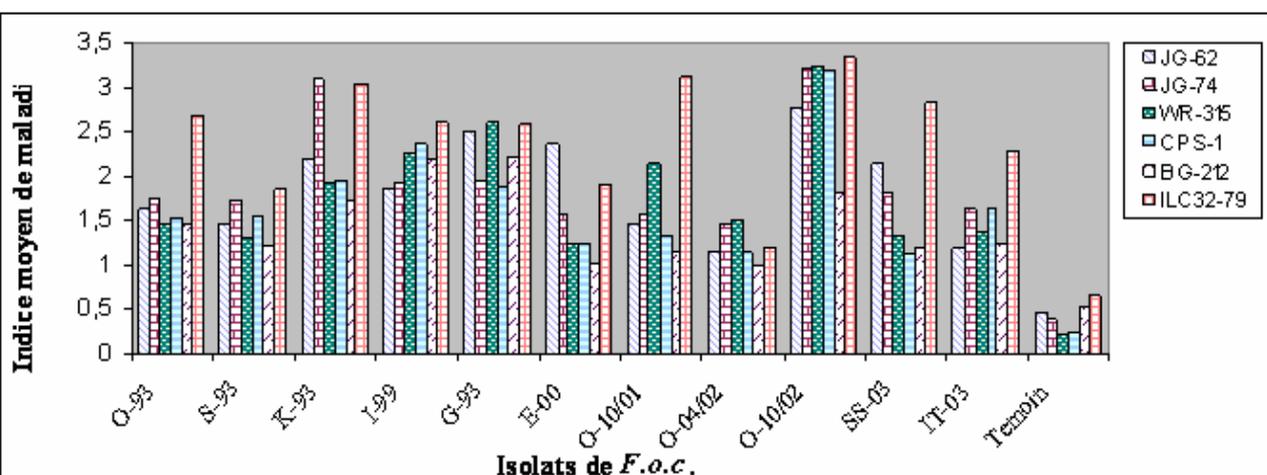


Figure 10: Représentation graphique de l'indice moyen de maladie au 40e j

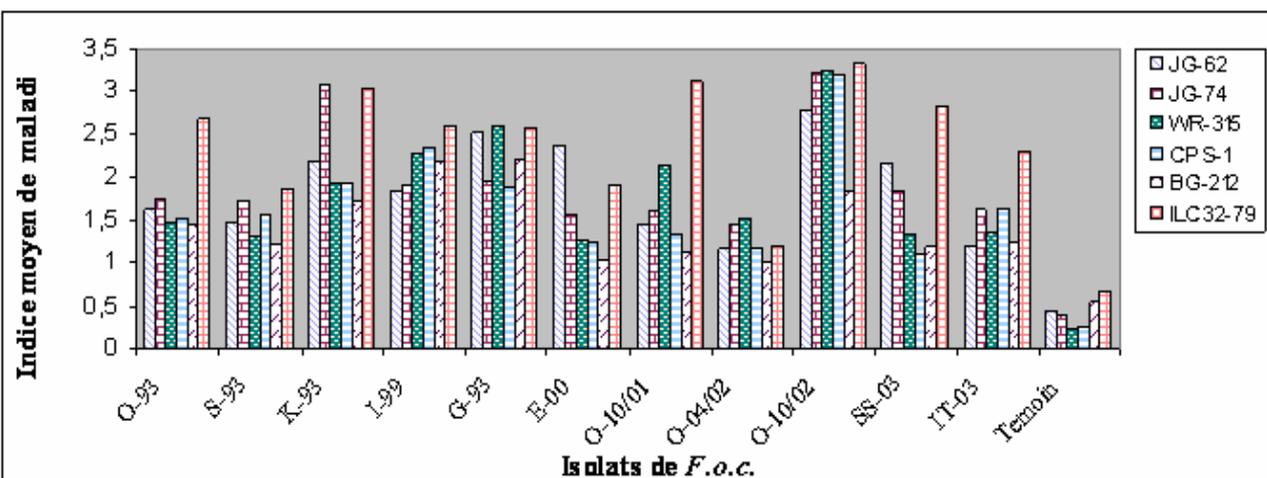


Figure 11: Représentation graphique de l'indice moyen de maladie au 60e j

L'analyse de la variance a été réalisée par le logiciel Excel qui a donné les résultats suivants (tabl. 8).

Tableau 8: Analyse de la variance pour les trois périodes de notation à 5%, 0,1% et 0,1%

Analyse la de variance à 05% 20 jours après inoculation

Source des Variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Valeur critique pour F
Isolats	3,39	11	0,31	1,79	1,967546647
Cultivars	0,58	5	0,12	0,67	2,382823301
Erreur	9,47	55	0,17		
Total	13,44	71			

Analyse de la variance à 0,1% 40 jours après inoculation

Source des Variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Valeur critique pour F
Isolats	19,233	11	1,75	13,676	3,48
Cultivars	4,61	5	0,92	7,21	4,82
Erreur	7,03	55	0,13		
Total	30,88	71			

Analyse de la variance à 0,1% 60 jours après inoculation

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Valeur critique pour F
Isolats	26,10	11	2,37	18,61	2,588651
Cultivars	6,02	5	1,20	9,44	3,369961962
Erreur	7,01	55	0,13		
Total	39,12	71			

Ces résultats sont relatifs aux deux facteurs, à savoir le facteur isolat et le facteur cultivar. Cette analyse a révélé une différence non significative à la première notation au sein des deux facteurs, et par conséquent un effet non significatif pour l'interaction isolat/cultivar.

L'analyse de la variance pour les données de la deuxième et troisième notation, montre un effet très hautement significatif pour l'un ou l'autre des facteurs, soit un effet significatif de l'interaction isolat/cultivar.

L'analyse des données en composantes principales (ACP) permet de regrouper les isolats selon leur agressivité (degré d'attaque) et leur virulence dans des groupes homogènes, correspondant aux trois périodes de lectures.

Pour les deux premières notations, nous avons retenu uniquement la projection sur le plan 1-2, dont le pouvoir de discrimination est de 55,03% pour la 1^{ère} notation (fig. 12), et de 81,01% pour la 2^{ème} notation (fig.13).

Les données de la troisième notation, semblent les plus significatives. Ainsi, la projection sur les plans des axes 1-2 et 1-3 avec un pouvoir de discrimination de 83,32% et de 78,32% respectivement, fait ressortir 3 groupes homogènes A, B et C sur le plan 1-2 (fig. 14), et 3 groupes homogènes A', B' et C' sur le plan 1-3 (fig. 15).

Au niveau du 1^{er} plan de projection, le groupe « A » comporte uniquement les isolats ayant provoqué le symptôme de flétrissement sur l'un des cultivars, tandis que le groupe « B » rassemble dans sa grande majorité les isolats ayant induit seulement le symptôme de jaunissement sur tous les cultivars, exception faite pour l'isolat O-10/01 qui a induit un flétrissement sur le cultivar ILC-3272. Quant au groupe C, il renferme uniquement l'isolat O-04/02 le moins agressif des isolats étudiés.

Au niveau du 2^{ème} plan de projection, constitué par les deux axes 1-3, le groupe A' comprend les isolats les plus agressifs provoquant l'un ou l'autre des symptômes.

Les isolats les moins agressifs à savoir, O-04/02, S-93 et IT-03, appartiennent au groupe B'.

Le groupe C' renferme quant à lui, uniquement l'isolat O-10/02 et qui s'est révélé l'isolat le plus agressif.

La projection des données sur le plan 2-3, montre un nuage de points dispersés, mais de par son faible pouvoir de discrimination par rapport aux deux premiers (18,36%), cette représentation n'a pas été prise en considération (fig.16).

Toutefois, L'ACP nous a permis de distinguer les isolats O-10/02, O-10/01, K-93, I-99 et G-93, responsables du symptôme de flétrissement. En ce qui concerne la virulence des isolats, l'isolat O-10/02 s'est révélé le plus virulent sur la plupart des cultivars ; les deux isolats O-04/02 et S-93 étant les moins virulents.

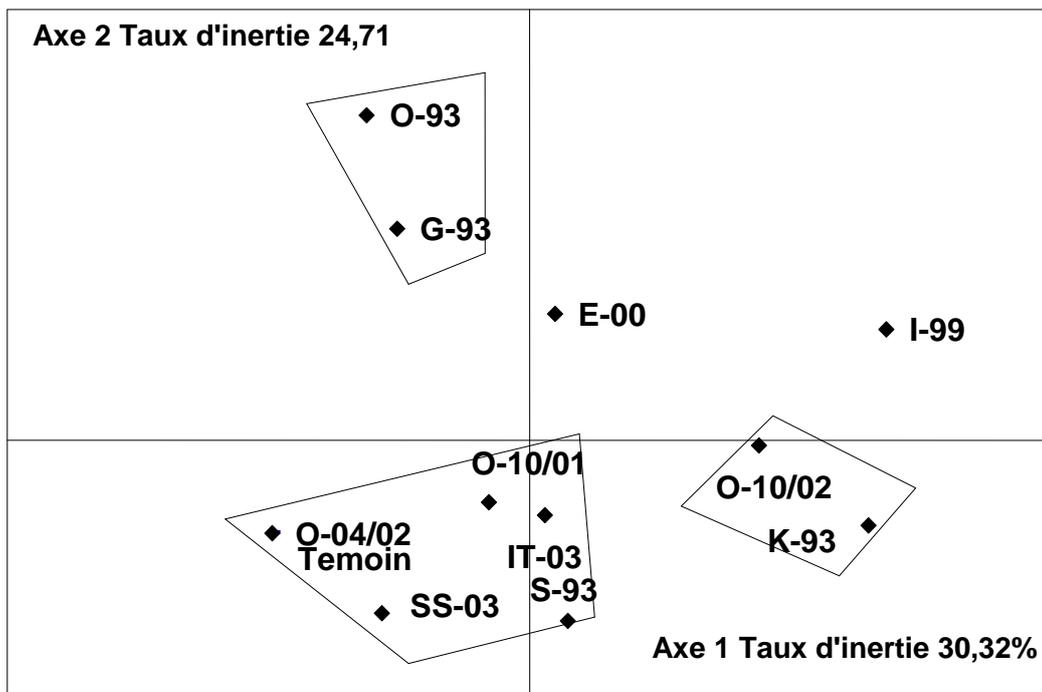


Figure 12: ACP pour l'indice moyen de maladie au 20 j sur le plan 1-2

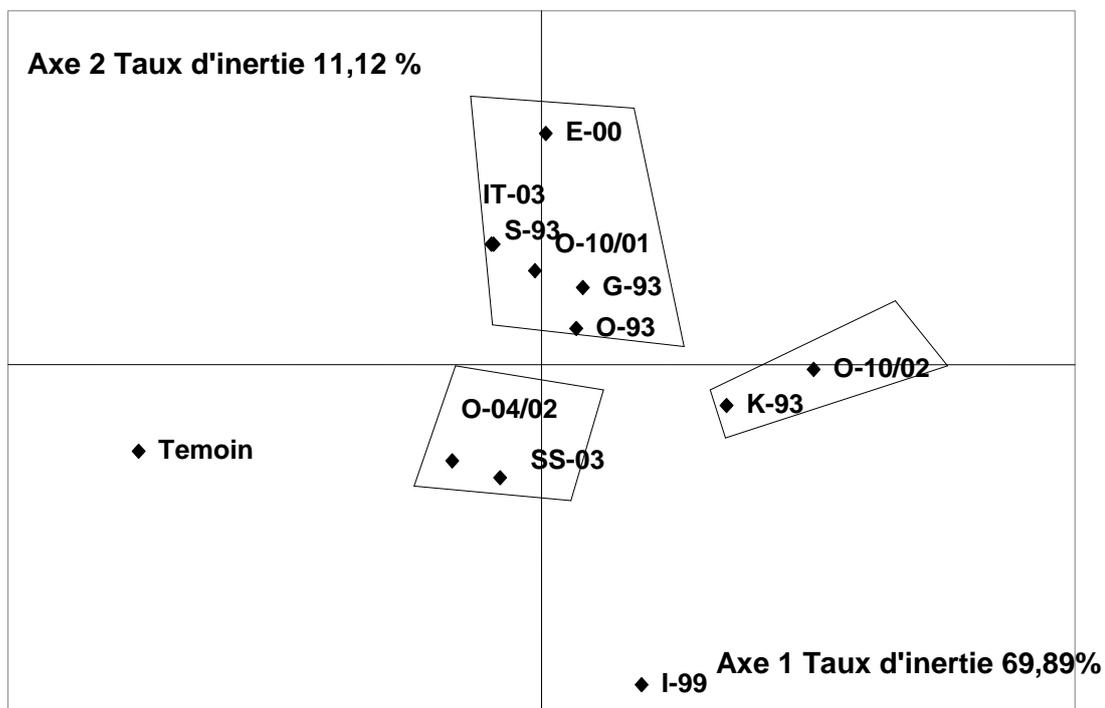


Figure 13: ACP pour l'indice moyen de maladie au 40 j sur le plan 1-2

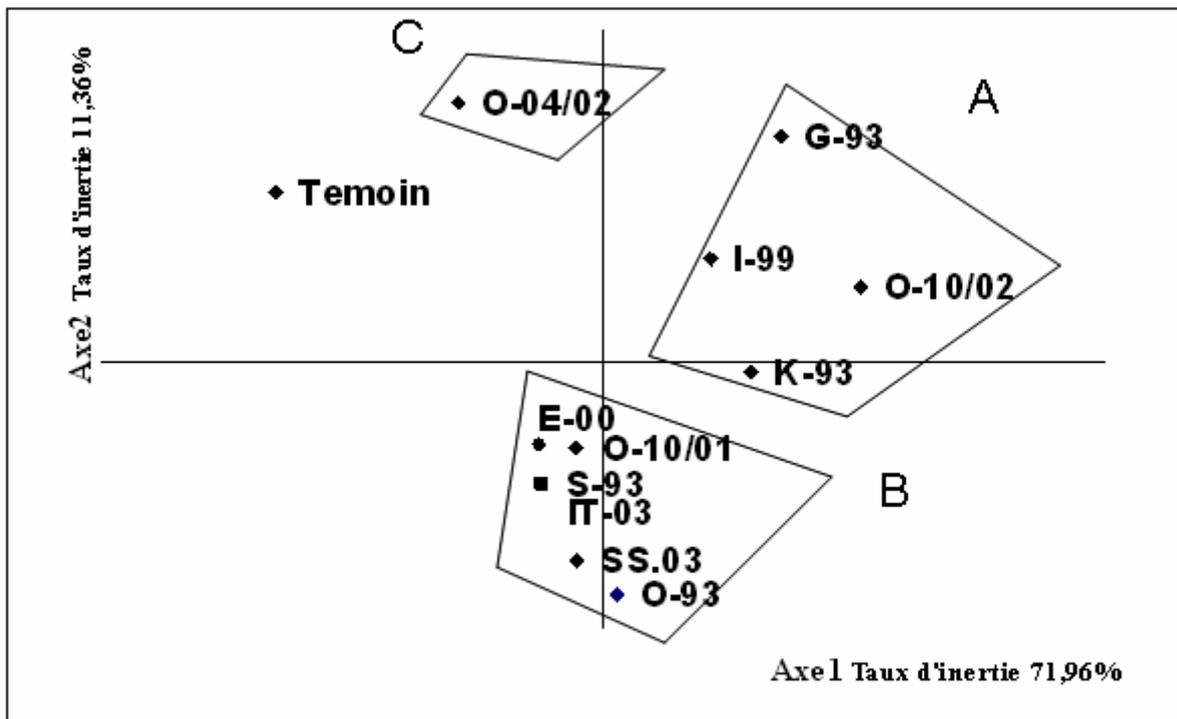


Figure 14 : ACP pour l'indice moyen de maladie au 60 j, sur le plan 1-2

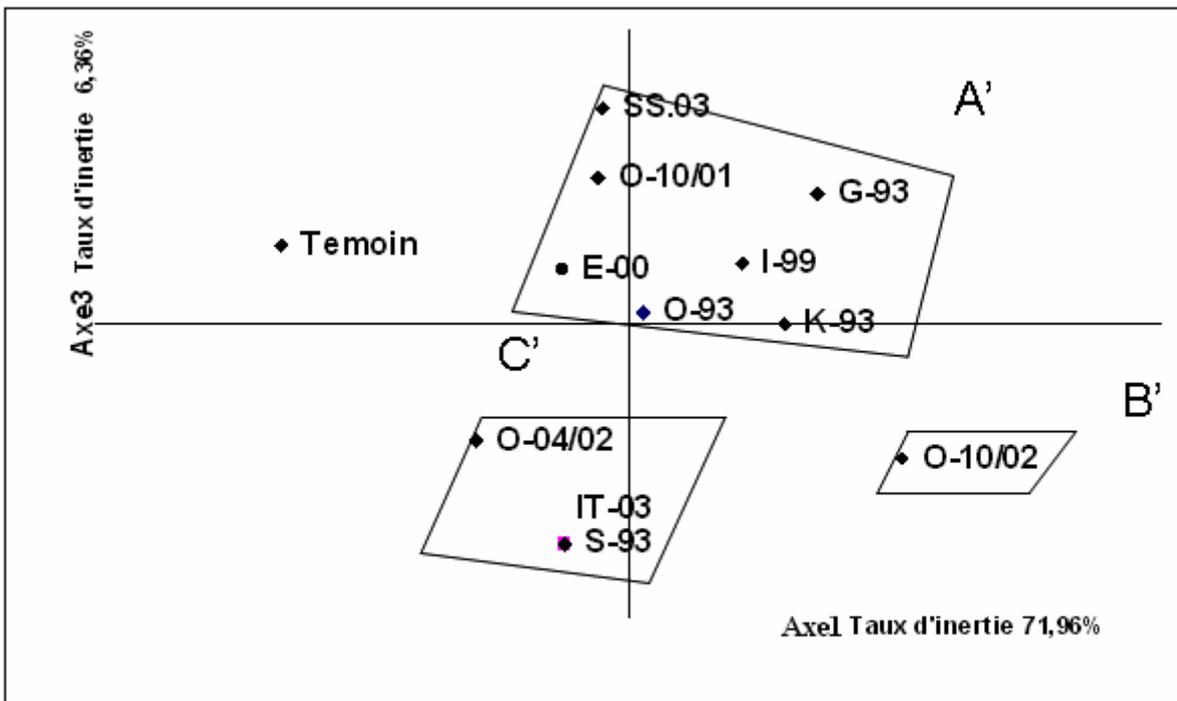


Figure 15 : ACP pour l'indice moyen de maladie au 60 j, sur le plan 1-3

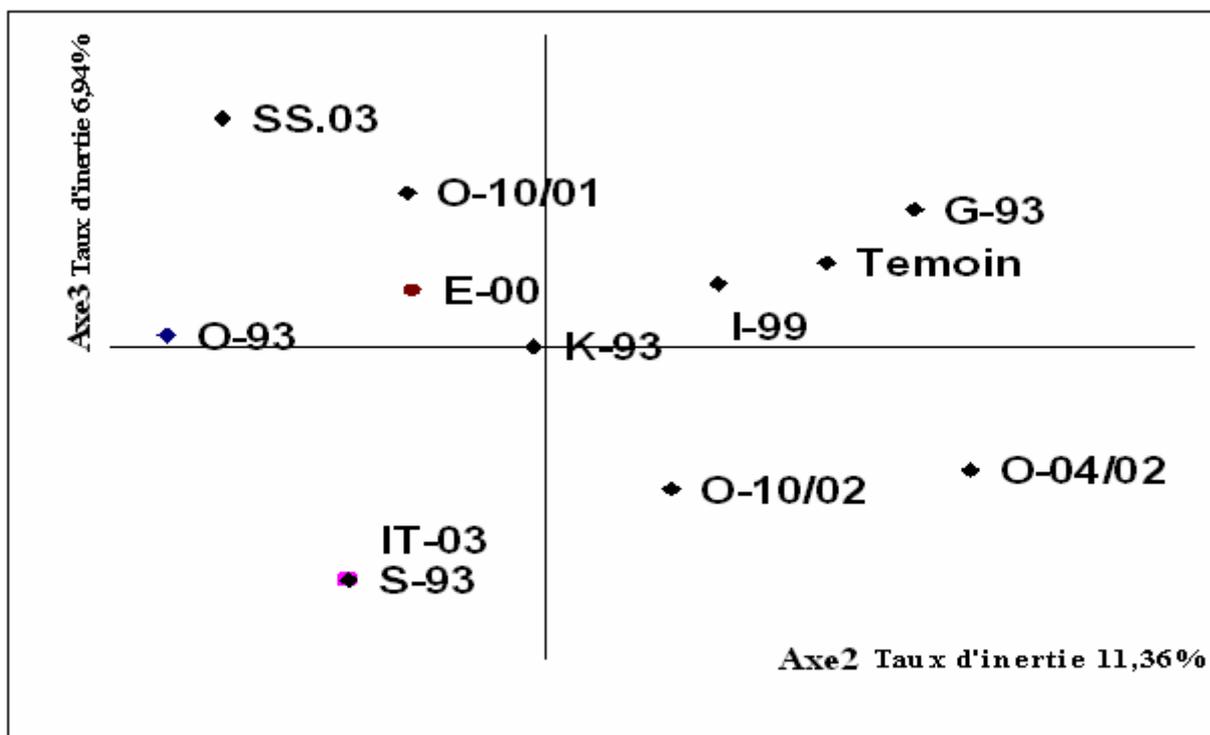


Figure 16: ACP pour l'indice moyen de maladie au 60 j, sur le plan 2-3

2.2/ Discussion

L'étude de la variabilité pathologique des isolats de *F.o.c.*, par inoculation artificielle de 6 génotypes de pois chiche, a montré une agressivité des isolats dont l'intensité varie selon l'isolat et le cultivar. Les deux symptômes qui se sont manifestés sont typiques au jaunissement foliaire et au flétrissement vasculaire, comparables à ceux décrits par Trapero Casas et Jemenez-Diaz (1985) puis Pérez-Artes et Tena (1989). Le ré-isolément de l'agent pathogène à partir des plantes inoculées, confirme l'appartenance des isolats au *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*.

L'induction des symptômes de flétrissement par les isolats K-93, O-10/01, O-10/02, G-93 et I-99, confirme les résultats obtenus par Stasaid (1991), Haddadi (1992) et Boumazouza et Ouddai (1994). Ainsi, le symptôme de flétrissement observé sur les cultivars JG-74, CPS-1, BG-212 et ILC-3279, et les différents types de réaction vis-à-vis des différents isolats testés, montrent une interaction différentielle entre les isolats et les cultivars étudiés.

L'existence d'une telle interaction différentielle, suggère la présence en Algérie de différentes races physiologiques de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*.

Une tentative de faire correspondre les différents isolats testés, aux races physiologiques existantes, fait ressortir le constat suivant :

En effet le type de réaction observé sur le cultivar desi JG-62, connu pour sa résistance vis-à-vis de la race 0, et sa sensibilité vis à vis de toutes les autres races (Kaiser & al., 1994), indique que ce cultivar est résistant vis-à-vis de la majorité des isolats qui ont provoqué uniquement le jaunissement sur les cultivars de la gamme différentielle, tels S-93, O-10/01, SS-03, IT-03 et O-04/02, qui ont induit un type de réaction se rapprochant de celui provoqué par la race 0, notamment l'isolat O-04/02 qui a montré un type de réaction comparable à celui de la race 0 sur les 4/5 des cultivars de la gamme différentielle, utilisée. Par conséquent, ces isolats peuvent appartenir à la race 0. L'isolats E-00, se rapproche plus tôt de la race 1 B/C, avec une légère différence enregistrée sur le cultivar JG-62 qui est sensible vis-à-vis de la race 1 B/C alors qu'il est moyennement sensible, avec un degré d'attaque de 2,36, vis-à-vis de l'isolat E-00, et le comportement du cultivar JG-74 connu pour sa résistance vis-à-vis de la race 1 B/C, par contre il est moyennement résistant, avec un degré d'attaque de 1,57, vis-à-vis de l'isolat E-00.

Concernant les isolats qui ont induit le symptôme de flétrissement, l'isolat O-10/02 a montré une réaction de sensibilité sur tous les cultivars, elle est comparable à celle induite par la race 2 sauf sur le cultivar BG-212, qui a montré une réaction de tolérance vis-à-vis de isolat O-10/02. Par contre il est sensible vis-à-vis de la race 2. L'isolat G-93, a montré un comportement pathologique correspondant à celui de la race 3, avec une seule différence avec le cultivar JG-74 qui est résistant vis-à-vis de la race 3, alors qu'il est tolérant avec un degré d'attaque de 1,95, vis-à-vis de l'isolat G-93 (Pérez-Artés & al., 1995 ; Jiménez-Gasco & al., 2004).

Contrairement aux précédents, les isolats O-93, K-93 et I-99 ont induit des types de réaction qui ne permettent pas de déduire de leur appartenance à aucune des races existantes.

D'une manière générale, le type de réaction des isolats à la gamme différentielle, a permis aussi bien aux isolats qu'aux cultivars, de mettre en évidence un comportement différentiel. Selon les niveaux d'attaque des cultivars vis-à-vis des différents isolats, ces derniers se répartissent en majorité dans deux groupes homogènes, tandis que l'isolat O-10/02 et l'isolat O-04/02 sont classés chacun dans un groupe, qui s'avère le plus agressif pour le premier et le moins agressif pour le deuxième.

L'ensemble de ces résultats suggère une diversité génétique des isolats de *F.o.c.* étudiés. Qui doit être confirmé par des outils performants.

3. CARACTERISATION GENETIQUE PAR RAPD

3.1/ Evaluation de la pureté de l'ADN :

L'extraction de l'ADN par la méthode CTAB, et l'évaluation de la pureté des extraits, basée sur la visualisation des bandes sur gel d'agarose (fig. 17) et, le rapport DO 260/280 par dosage au spectrophotomètre, montrent que les extraits d'ADN obtenus ne sont pas suffisamment purs. Cependant, indépendamment de la qualité des profils de migration, il reste que ce protocole semble convenir le mieux pour les isolats de *F. o. c.*

L'estimation de la qualité et des quantités de l'ADN obtenues et dosées par spectrophotométrie à UV, sont mentionnés dans la tabl. 9.

Tableau 9 : Résultats du dosage de l'ADN par spectrophotométrie

Isolats	DO 260 nm	DO 260/DO 280	DO 280 nm	Concentration d'ADN (µg/ml)
K-93	0,0004	1,6	0,0003	2
E-00	0,0006	1,5	0,0004	3
IT-03	0,0030	1,5	0,0020	15
SS-03	0,0004	1,4	0,0003	2
I-99	0,0040	1,6	0,0025	20
S-93	0,0044	1,4	0,0031	22
O-93	0,0008	1,5	0,0005	4
O-10/01	0,0006	1,3	0,0005	3
O-04/02	0,0010	1,6	0,0006	5
O-10/02	0,0004	1,5	0,0003	2
G-93	0,0006	1,3	0,0005	3
FB	0,0030	1,4	0,0021	15
Fpp	0,0002	1,4	0,0001	1
FH	0,0002	1,5	0,0001	1

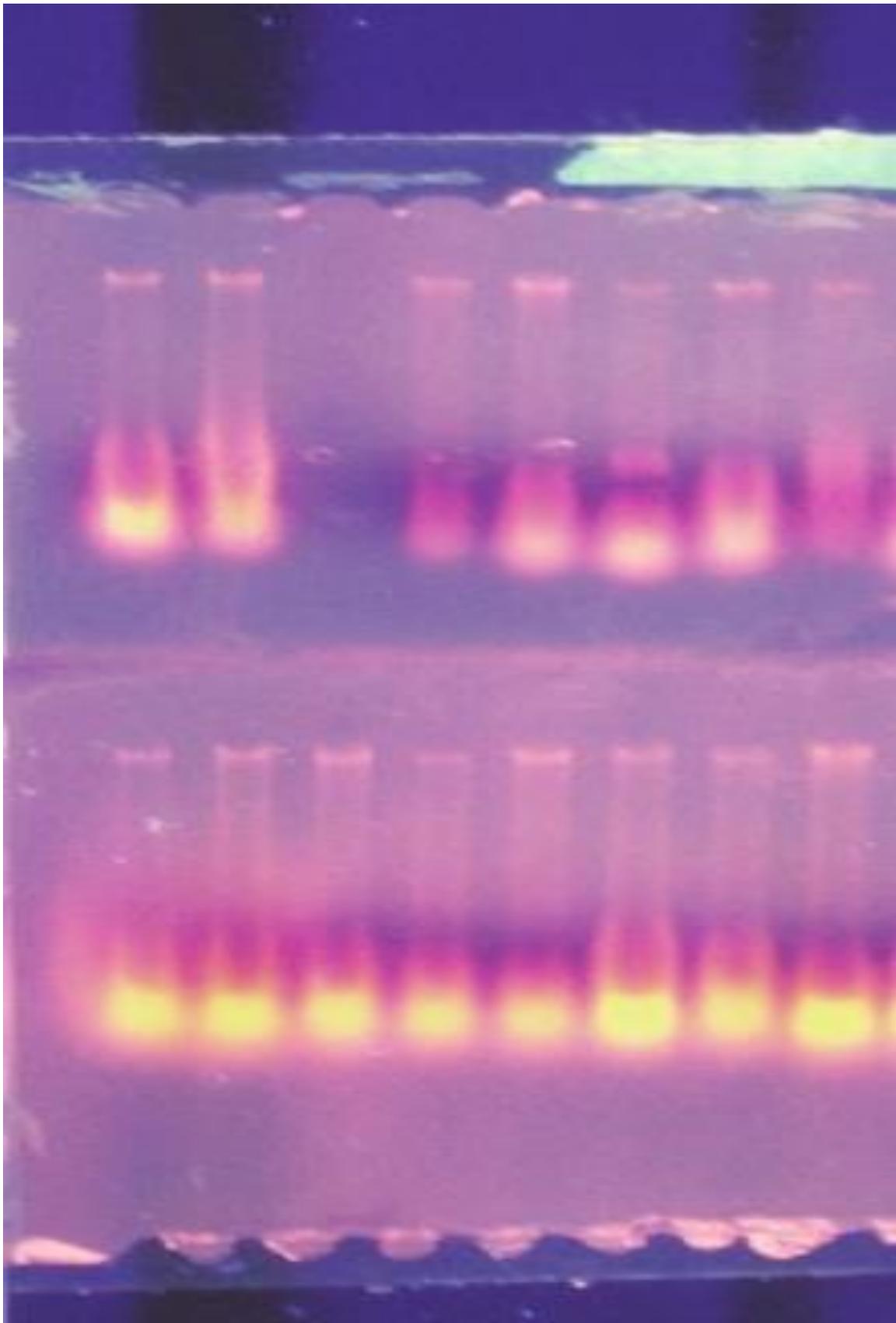


Figure 17 : Extraits d'ADN, obtenus par le protocole CTAB X1, à partir de 4 g de mycélium de *Fusarium*

3.2/ Analyse des profils d’RAPD de l’ADN des isolats de *F. o. c.*

Les extraits d’ADN des isolats étudiés (Tabl. 3) amplifiés avec les deux amorces OPF10 et OPI 01, ont produit 9 et 15 bandes respectivement. Chacune des deux amorces a produit des profils spécifiques à chacun des isolats ou à un groupe d’isolats. Ainsi, les deux isolats IT-03 et S-93 ont donné le même profil par l’amorce OPF10 ; la même remarque est valable pour les deux isolats FB et Fpp (fig. 18). Par ailleurs, l’amorce OPI 01 a également, généré un même profil pour les isolats S-93, O-04/02 et O-93, alors que cette même amorce n’a pas amplifié les isolats E-00, I-99 et FB (fig. 19). Il en est de même pour l’amorce OPF 10 qui n’a pas non plus amplifié l’isolat FH.

L’ensemble des profils obtenus est représenté schématiquement (fig. 20 et 21). L’élaboration de la matrice correspondant à l’ensemble des profils obtenus (Annexe 4), représentée par la présence ou l’absence de chacune des bandes avec les deux amorces OPF 10 et OPI01, permettant de révéler un grand polymorphisme, au point où aucune bande n’est commune à tous les isolats. Toutefois le profil de certains isolats montre des bandes spécifiques, comme pour l’amorce OPI 01 :

- L’isolat IT-03 a une bande spécifique, la bande 3 avec l’amorce OPI 01.
- L’isolat O-10/01 présente 1 bande spécifique : la bande 10 avec l’amorce OPI 01.
- L’isolat O-10/02 possède la bande spécifique 15 avec l’amorce OPI 01.
- L’isolat Fpp possède les bandes spécifiques 2, 5 et 7 avec l’amorce OPI 01.

De plus, certaines bandes sont communes à deux isolats, tel que :

- La bande 9 obtenue avec l’amorce OPI est commune aux isolats O-10/02 et FH.
- Les deux isolats K-93 et IT-03 présentent en commun la bande 13 obtenue avec OPI 01.

Pour l’amorce OPF 10 :

- L’isolat O-10/01 présente 1 bande spécifique : la bande 1 avec l’amorce OPF 10.
- La bande 4 obtenue avec l’amorce OPF 10, est commune pour les deux isolats K-93 et O-93.
- La bande 2 obtenue avec l’amorce OPF 10 est commune aux isolats O-04/02 et O-10/02.

Certaines bandes sont communes à plusieurs isolats, tel que les deux bandes 6 et 14 obtenues avec OPI 01, chacune de ces deux bandes est communes à 8 isolats.

K-93 E-00 IT-03 SS-03 I-99 S-93 O-93 O-10/01 O-04/02 O-10/02 G-93 FB Fpp FH

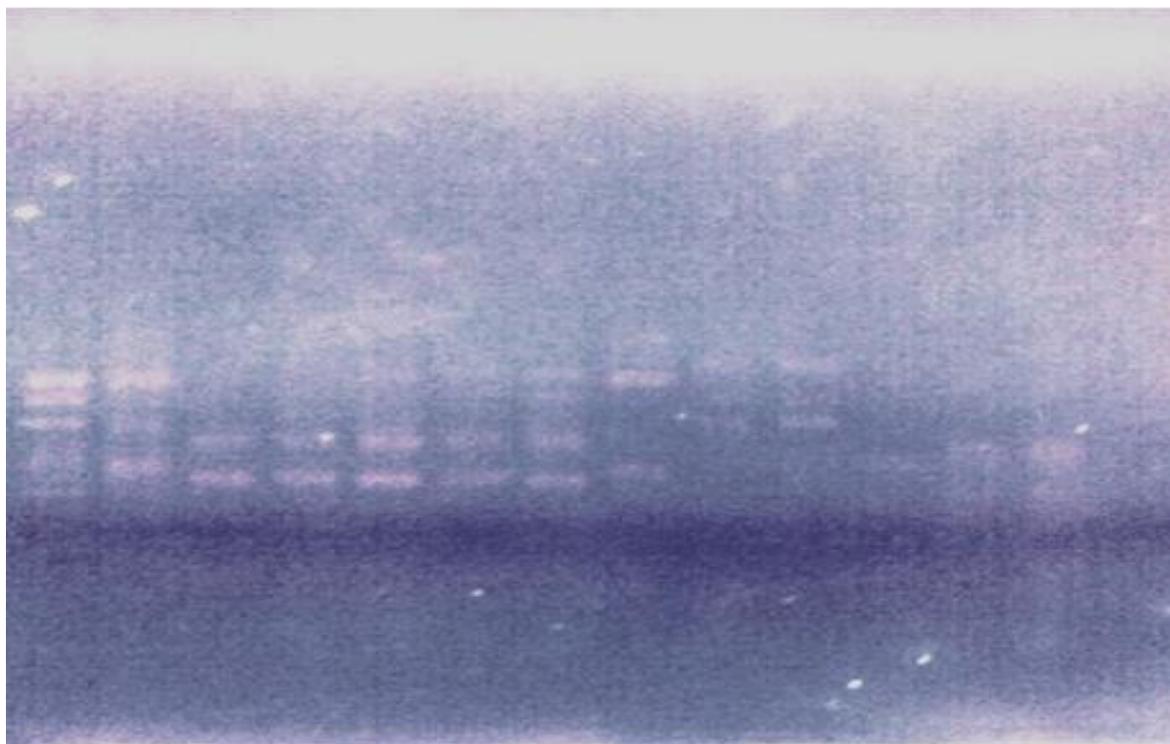


Figure 18 : Profils d'amplification obtenus avec l'amorce OPF 10

K-93 E-00 IT-03 SS-03 I-99 S-93 O-93 O-10/01 O-04/02 O-10/02 G-93 FB Fpp FH

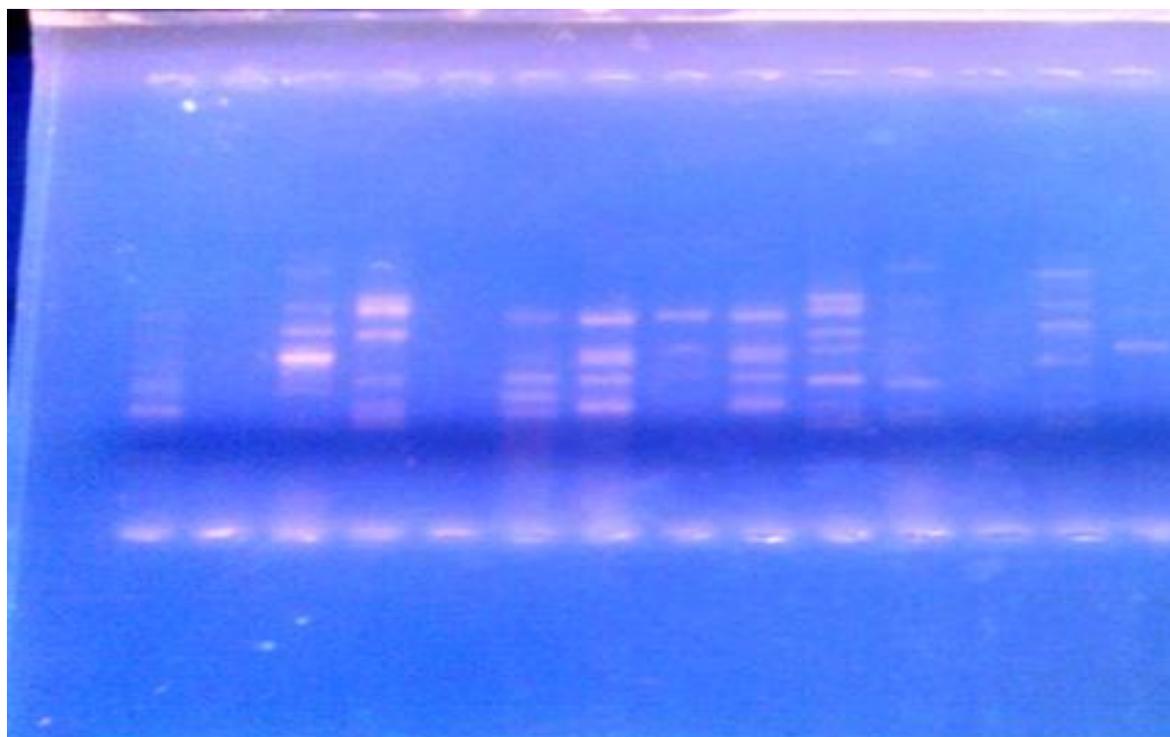
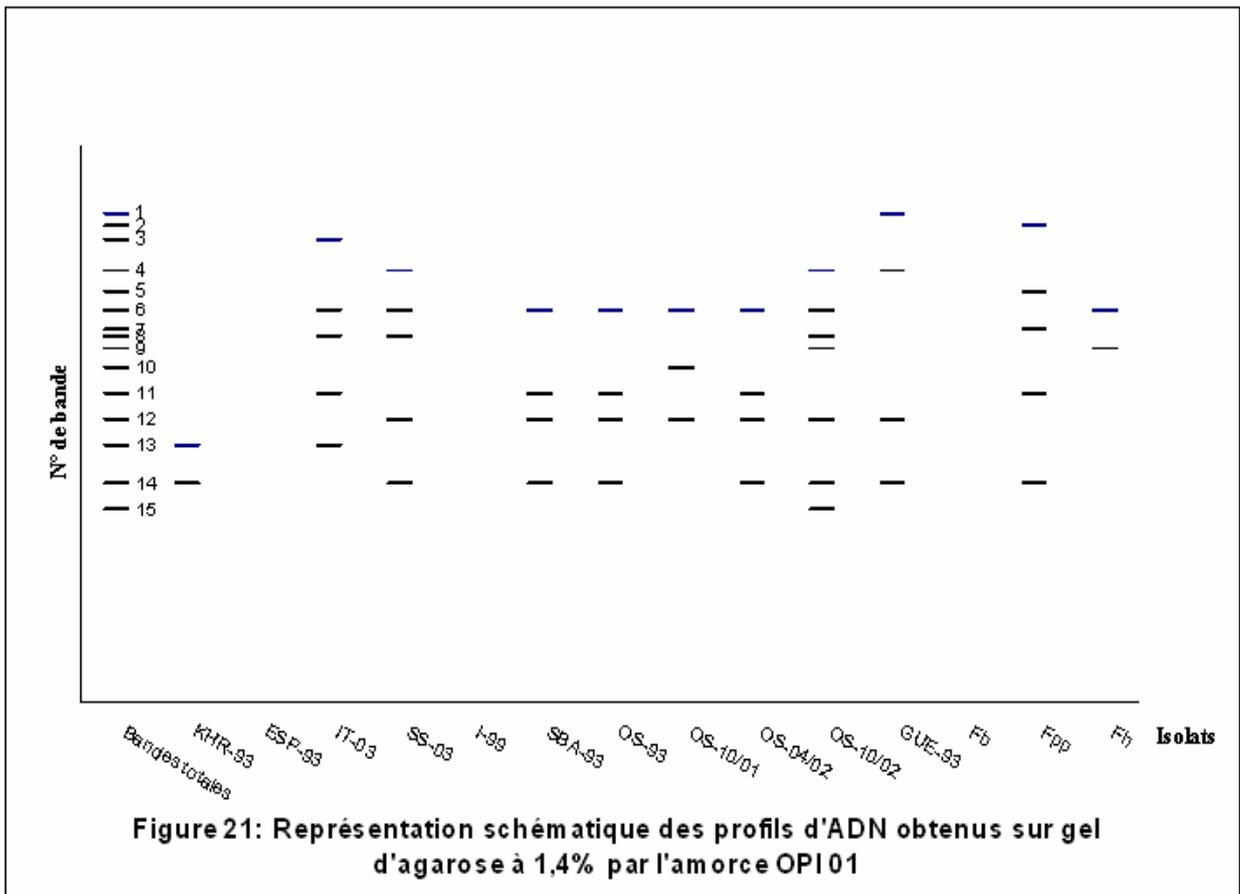
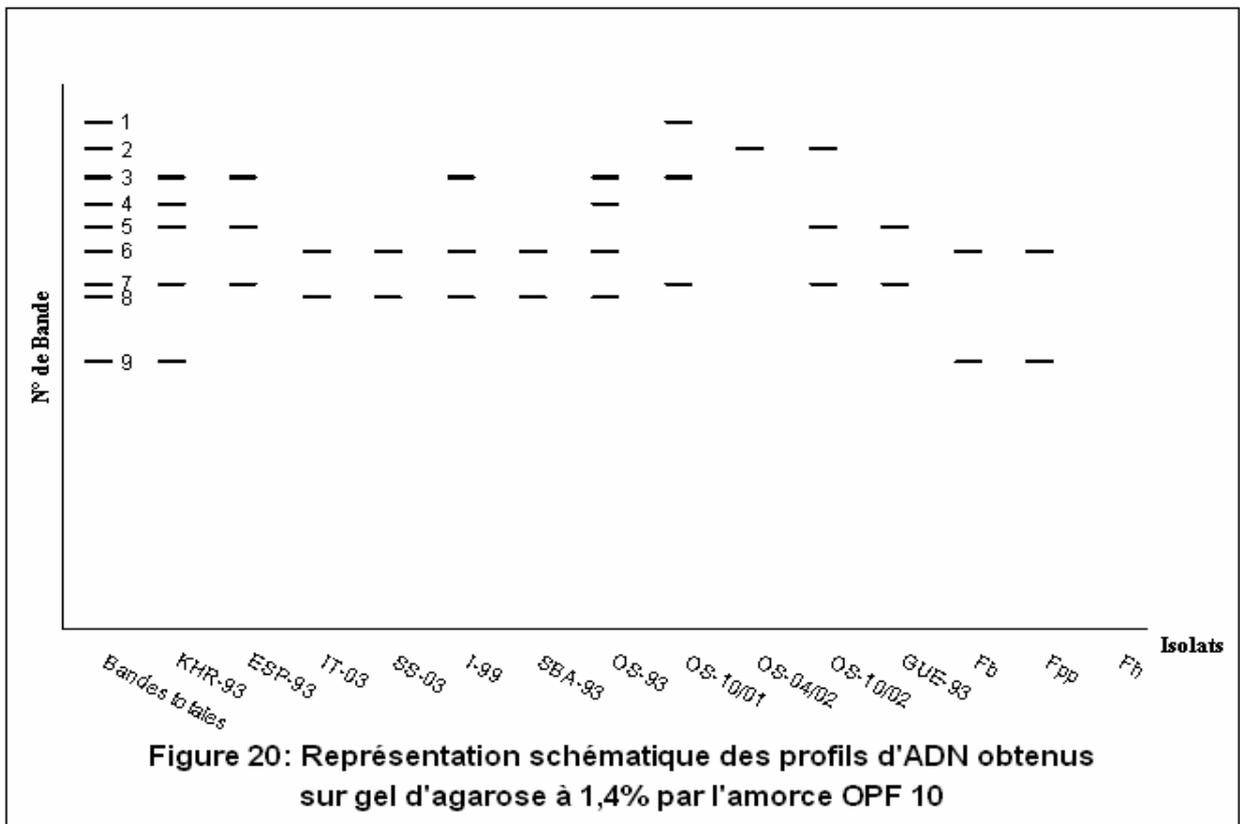


Figure 19 : Profils d'amplification obtenus avec l'amorce OPI 01



Nos résultats ont été analysés selon deux méthodes d'analyse :

1. Méthode de classification hiérarchique ou dendrogramme : Une représentation arborée (dendrogramme) a été établie pour les profils de chacune des deux amorces d'une part, puis une représentation globale des profils obtenus par les deux amorces d'autre part. Cela permet la classification des isolats selon leur degré de similarité, basé sur l'indice de Jaccard's. Cette classification fait ressortir différents groupes au degré de similarité de 0,5 et plus. Selon l'amorce considérée, le classement des isolats s'établit différemment. Ainsi, avec l'amorce OPF 10, le classement s'établit comme suit :

_ Groupe 1 : rassemble les cinq isolats de *F.o.c.*, SS-03, S-93, IT-03, I-99 et O-93 avec une similarité relative de 58%.

_ Groupe 2 : associe les deux isolats FB et Fpp. Avec une similarité de 100%

_ Groupe 3 : avec un degré de similarité relative de 58%, les isolats O-10/02, E-00 et G-93 s'associent dans un seul groupe (fig. 22).

Avec l'amorce OPI 01 nous distinguons :

_ Un premier groupe constitué par les trois isolats S-93, O-04/02 et O-93 ayant une similarité relative de 100%.

_ Un deuxième groupe constitué par les isolats SS-03 et O-10/02 ayant un degré de similarité relative de 72%.

Le reste des isolats sont dispersés individuellement selon un degré de similarité relative de 50% (fig. 23).

En intégrant l'ensemble des profils d'amplification, générés par les deux amorces, le dendrogramme obtenu permet de distinguer au degré de similarité de 55% un seul groupe comportant 3 isolats : SS-03, O-93 et S-93, où les deux derniers sont plus proches entre eux qu'avec le premier (fig. 24).

La deuxième méthode d'analyse en comparant les isolats par l'analyse en composantes principales (ACP). Cette méthode d'analyse multidimensionnelle, permet une analyse globale de la totalité des fragments obtenus par les deux amorces et pour tous les isolats.

Ainsi, la projection des points représentant les isolats sur le plan 1-2, avec un pouvoir de discrimination de 43,26 % (24.38% +18.88%) sur 57,79 % (24.38% +18.88% +

14.53%) du pouvoir discriminant des trois axes, révèle trois groupes homogènes d'isolats.

Groupe 1 :

Ce groupe représenté par les points isolats O-10/02, G-93, O-10/01, E-00 et K-93, est assez proche du groupe dont les bandes 7, 8 et 11 sont similaires avec l'amorce OPF 10, et de la bande 15 avec l'amorce OPI 01.

Groupe 2 :

Dans ce cas, le groupe des points isolats O-04/02, SS-03, FH, S-93 et O-93 sont un peu plus proches, comme il est montré par leur comportement similaire vis-à-vis d'un nombre plus important de bandes en l'occurrence, les bandes 1, 5, 7 et 9 avec l'amorce OPF 10 et les bandes 1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, 13 et 15 avec l'amorce OPI 01.

Groupe 3 :

Enfin les isolats IT-03, I-99, FB et Fpp sont rassemblés au sein de ce groupe, disposés deux par deux. D'une part, les deux isolats IT-03 et I-99 de *F.o.c.* sont très proches dont la plupart des bandes sont communes à l'exception de 6 bandes sur 24. Ils diffèrent par la bande 1 pour l'amorce OPF 10 et par les bandes 3, 6, 8, 11 et 13, pour l'amorce OPI 01. D'autre part, les deux isolats F.B. et Fpp. sont comparables par la majorité des bandes, à l'exception des bandes 2, 5, 7, 11 et 14, pour l'amorce OPI 01 (Annexe 4).

La projection faite sur le plan 1-3, ayant un pouvoir discriminant total de 38,91% (24.38% + 14.53%), révèle un rapprochement très prononcé entre les deux isolats E-00 et K-93, par l'existence d'un nombre élevé de bande communes, à l'exception des deux bandes 4 et 9 pour l'amorce OPF 10 et les deux bandes 13 et 14 pour l'amorce OPI 01. Il en est de même pour les deux isolats O-10/01 et G-93, qui ne diffèrent que par 8 bandes parmi les 24 bandes recensées, à savoir les bandes 1, 3 et 5 pour l'amorce OPF 10 et les bandes 1, 4, 6, 10 et 14 pour l'amorce OPI 01 (Annexe 4).

La dernière projection, faite sur le plan 2-3, fournit 33,41 % (18.88% + 14.53%) de l'information, soit un taux d'inertie (pouvoir discriminant) faible par rapport aux deux premiers plans. Cette représentation montre dans ce cas une dispersion des groupes d'isolats, ce qui confirme la tendance du dendrogramme à des degrés de similarité faibles (Annexe 4).

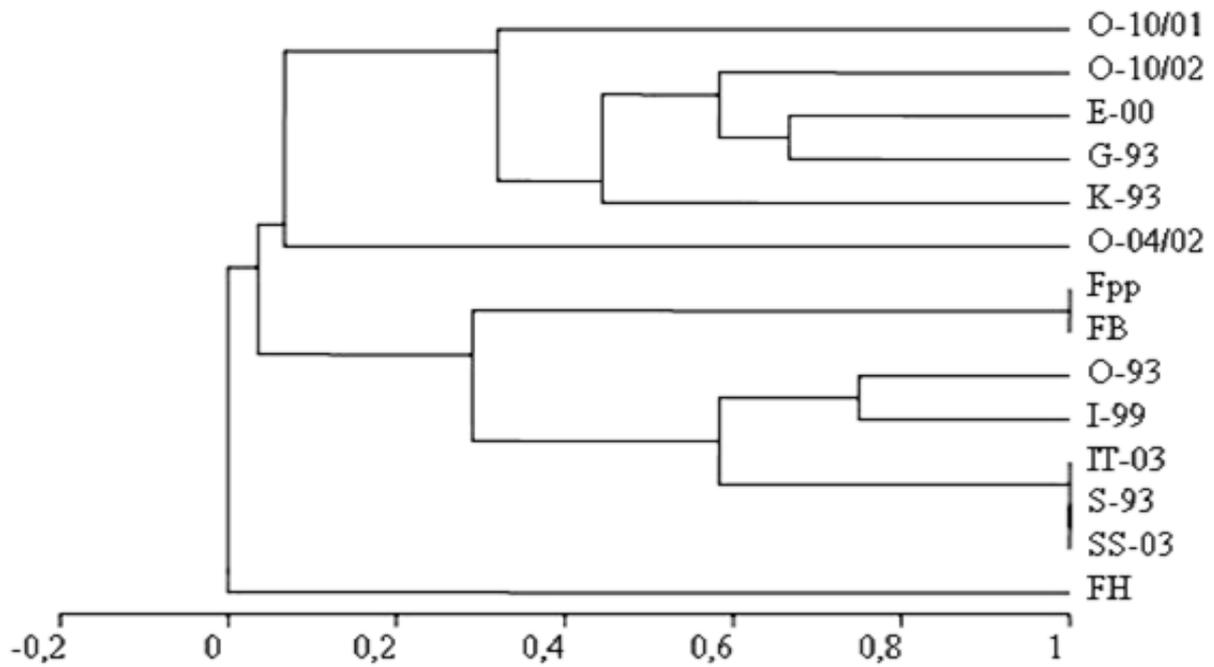


Figure 22: Classification hiérarchique des isolats de *Fusarium* avec l'amorce OPF 1 0 établie par la méthode UPGMA en utilisant le coefficient de Jaccard's

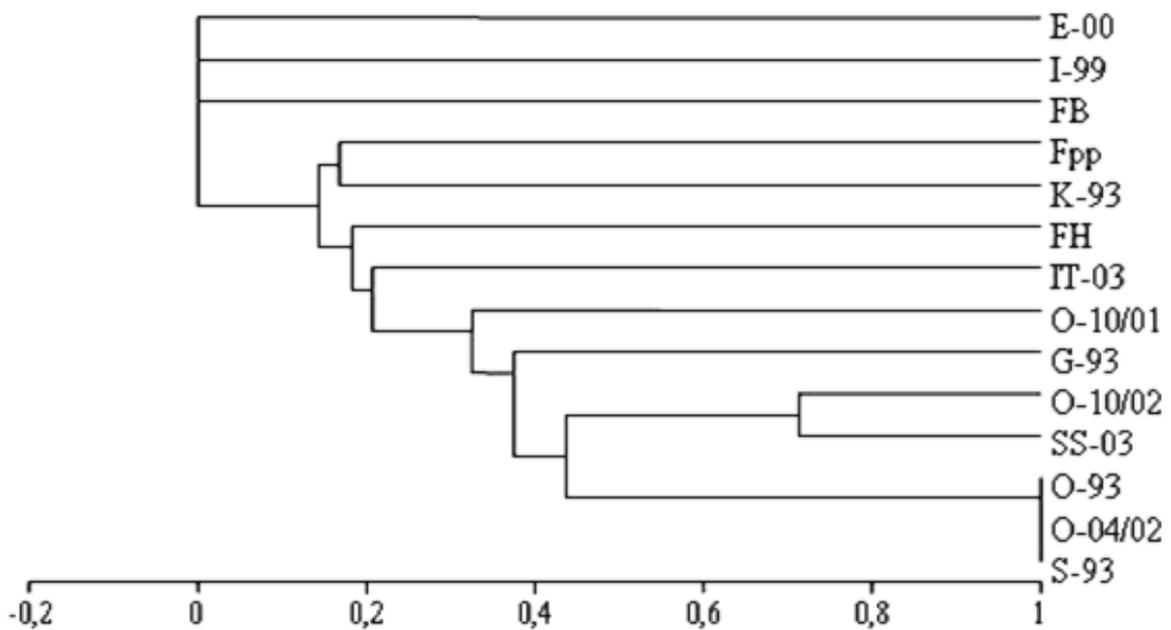


Figure 23: Classification hiérarchique des isolats de *Fusarium* avec l'amorce OPI 01 établie par la méthode UPGMA en utilisant le coefficient de Jaccard's

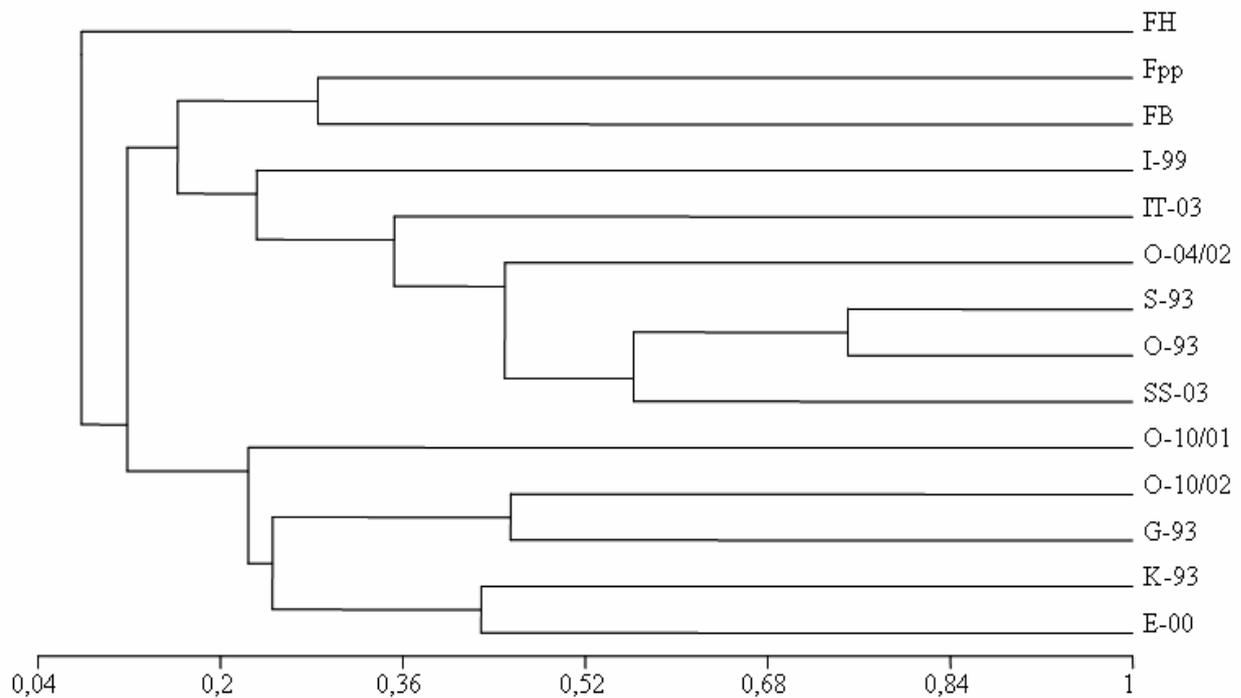


Figure 24: Classification hiérarchique des isolats de *Fusarium oxysporum* avec les deux amorces OPF 10 et OPI 01 établie par la méthode UPGMA en utilisant le coefficient de Jaccard's

3.3/ Discussion

L'amplification par RAPD de l'ADN des 11 isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp.*ciceris*, et de 3 autres isolats de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* spp, *Fusarium solani* et *Fusarium graminearum*), isolées respectivement à partir de petit pois, haricot et blé dur), avec les deux amorces OPF 10 et OPI 01, révèle une variabilité génétique relativement importante. Ainsi, l'amorce OPF 10 a généré 10 profils différents, et l'amorce OPI 01 a généré 9 profils différents. Le nombre de bandes varie entre 1 et 7 pour chacun des profils. Au total, 24 bandes ont été dénombrées, mais, aucune bande n'est spécifique aux 14 isolats étudiés. Certaines bandes spécifiques à certains isolats, pourraient être de bons marqueurs d'identification, alors que d'autres bandes sont communes à plusieurs isolats.

Deux types d'analyse statistique complémentaires ont été réalisés : une analyse en composantes principales (ACP) et une classification hiérarchique appliquées sur une matrice à deux entrées.

Pour le premier type d'analyse, les plans de projection en composantes principales examinées, seul le plan 1-2 s'est avéré plus représentatif à regrouper les mêmes

isolats que ceux du dendrogramme qui englobe les deux amorces. Ces deux méthodes d'analyse permettent de classer les trois isolats SS-03, O-93 et S-93 nettement, dans un groupe homogène, et à moindre degré l'isolat O-04/02. Les autres isolats se sont montrés génétiquement plus ou moins éloignés les uns des autres de par leur distance génétique. Cela semble indiquer un polymorphisme important au sein de ce groupe d'isolats, et par voie de conséquence une grande variabilité de cette forme spéciale de *Fusarium oxysporum*.

L'analyse en composantes principales nous a permis également, de constater une certaine corrélation avec les résultats obtenus par l'étude de la variabilité pathologique. Si l'on considère la projection du nuage de points sur les plans 1-2, pour les deux études, tel que les 3 isolats SS-03, O-93 et S-93, qui ont induit uniquement le symptôme de jaunissement, se retrouvent toujours dans un même groupe, aussi bien sur le plan analyse polymorphique d'ADN que pathologique. De même, la projection sur les plans 1-3, associe les deux isolats G-93 et O-10/01 qui ont induit tous les deux, le symptôme de flétrissement. Cette différence de comportement suggérerait l'appartenance de ces deux groupes d'isolats à deux races physiologiques différentes. Cependant, cette classification ne coïncide pas avec les résultats de l'électrophorèse des protéines totales, obtenus antérieurement avec les mêmes isolats par Debbi, (2001).

En conclusion, cette étude nous a permis de mettre en évidence une variabilité génétique des isolats de *F.o.c.*, et de confirmer également la variabilité pathologique révélée par l'étude du pouvoir pathogène sur une gamme d'hôte différentielle. Cependant, les résultats obtenus restent insuffisants pour une identification précise des races physiologiques. Toutefois, Kelly et al., (1998), a déterminé par RAPD une bande d'ADN de 1,6 Kb, spécifique pour la race 5, obtenu avec l'amorce KS (Stratagene, 5'- C G A G G T C G A C G G T A T C G-3'. De plus, dans une étude menée par Jiménez-Gasco & al., (2001), deux groupes RAPD correspondant aux races 0 et 1B/C, et un troisième groupe RAPD correspondant aux pathotypes de flétrissement, ont été également identifiés

L'analyse d'un plus grand nombre d'isolats avec une gamme suffisante d'amorce et l'utilisation de souches de référence, pourraient conduire à une identification plus précise des races physiologiques existantes en Algérie, et une meilleure connaissance du polymorphisme génétique des isolats.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail constitue une contribution à l'étude de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, agent responsable du flétrissement de pois chiche, une maladie qui est à l'origine de pertes de rendement qui peuvent atteindre les 40%, voire 100% dans certains cas (Halila & Strange, 1996).

Bien que, des mutants « nit » soient sélectionnés et caractérisés, l'étude de la compatibilité végétative n'a pas abouti à mettre en évidence une quelconque compatibilité entre les isolats, et par conséquent, aucun groupe de compatibilité végétative n'est identifié.

L'étude pathologique, par l'inoculation artificielle d'une gamme différentielle composée de six génotypes de pois chiche, a mis en évidence les deux symptômes, que peut causer habituellement ce champignon, à savoir le jaunissement foliaire et le flétrissement vasculaire.

L'analyse en composantes principales nous a permis de distinguer les isolats O-10/02, O-10/01, K-93, I-99 et G-93, responsables du symptôme de flétrissement. En ce qui concerne la virulence des isolats, l'isolat O-10/02 s'est révélé le plus virulent sur la plupart des cultivars ; les deux isolats O-04/02 et S-93 étant les moins virulents. Ces résultats laissent supposer la présence de différentes races physiologiques parmi les isolats étudiés.

L'étude moléculaire de ces isolats par RAPD, a montré un polymorphisme remarquable au sein des isolats étudiés. Cette variabilité a déjà été révélée par des études préalables sur 99 isolats de *F.o.c.* par Jiménez-Gasco & al. (2001)

s. Les méthodes d'analyse statistique utilisées, ont permis de différencier deux groupes d'isolats : le premier groupe renferme les isolats SS-03, O-93 et S-93, et le deuxième groupe renferme les deux isolats O-10/01 et G-93. Ce résultat confirme une légère corrélation avec les résultats de l'étude pathologique. Le reste des isolats ont chacun un comportement spécifique.

En revanche, l'étude comparative de la variabilité génétique des 11 isolats de *F.o.c.*, a permis de mieux les caractériser. Toutefois si les corrélations étaient difficiles à établir, l'A.C.P. fait ressortir certaines tendances mettant en évidence deux classes, selon leur comportement pathologique et moléculaire.

Classe 1 :

Les isolats SS-03, O-93, et S-93 qui ont induit un symptôme de jaunissement, se trouvent toujours dans un même groupe aussi bien sur le plan pathologique que moléculaire.

Classe 2 :

Les deux isolats G-93 et O-10/02 ont induit un symptôme de flétrissement, et appartiennent au même groupe sur le plan moléculaire.

Toute fois, l'utilisation d'une gamme d'hôte différentielle complète, un nombre d'amorce suffisant, d'autres marqueurs moléculaires, des souches de référence et un nombre d'isolats plus important, pourraient conduire à mieux affiner la variabilité génétique des isolats testés, et identifier les races physiologiques de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* qui peuvent exister en Algérie.

Au terme de ce travail, l'étude devrait être étendue à un nombre plus important d'isolats provenant de différentes régions du pays. D'autre part, cette étude devra également être complétée par la comparaison des isolats étudiés avec des souches de *F.o.c.*, déjà identifiés, afin d'obtenir des éléments de réponse, quant à l'identification des races physiologiques de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* qui existent en Algérie.

Références bibliographiques

1. **Ahn, I. P., Chung, H. S. & Lee, Y. H. 1998.** Vegetative compatibility groups and pathogenicity among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Plant Dis.* **82**: 244-246.
2. **Alabouvette, C., De La Broise, D., Lemanceau, P., Couteaudier, Y. & Louvet, J. 1987.** Utilisation de souches non pathogènes de *Fusarium* pour lutter contre les fusarioses : situation actuelle dans la pratique. *Bull. OEPP*, **17**: 665-674.
3. **Arora, D. k. & Pandey, A. K. 1989.** Effects of soil solarization on *Fusarium* wilt of chickpea. *J. Phytopathol.* **124**: 13-22.
4. **Bayraktar, H., Dolar, F. S. & Maden, S. 2008.** Use of RAPD and ISSR markers in detection of genetic variation and population structure among *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates on chickpea in Turkey. *J. Phytopathol.* **156**: 146-154.
5. **Boumazouza, A. & Ouddai, W. 1994.** Recherche sur la fusariose du pois chiche en Algérie causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (Padwik) emend snyd et Hans, variabilité du pouvoir pathogène et résistance variétale. Mémoire ing. INA. El-Harrach. 89 p.
6. **Bouznad, Z., Corbiere, R., Labdi, M. & Spire, D. 1997.** Apport des techniques biochimiques et moléculaires pour la caractérisation des champignons pathogènes des légumineuses à grosses graines, dans les pays du pourtour méditerranéen. Ed. INRA. Paris 1998 (Les colloques n° 88) : 104-127.
7. **Bouznad, Z., Maatougui, M. E. H., Mouri, N. & Beniwal, S. P. S. 1998.** Comportement en plein champ de quelques fongicides utilisés en

traitement contre *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. agent de l'antracnose du pois chiche. *Céréaliculture ITGC*. **32**: 15-18.

8. **Brayford, D. 1992.** *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Mycopathologia*, **118**: 43-44.

9. **Bridge, P., Couteaudier, Y. & Clarkson, J. 1998.** Molecular variability of fungal pathogens. Edited by CAB International Wallingford Oxon OX10 8DE UK :187-207.

10. **Correll, J. C., Klittich, C. J. R., Leslie, J. F. 1987.** Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology*. **77** : 1640-1646.

11. **Debbi, A. 2002.** Etude de la variabilité morphologique et culturale, pathologique et biochimique, et mise au point de l'extraction de l'ADN de *Fusarium oxysporum* Schlenchtend : Fr. f. sp. *ciceris* (Padwik) Matuo et K. Sato. Mémoire ing. Agro. INA. El-Harrach. 56 p.

12. **Dechmi, N., Bermad, A. & Tachet, K. 1997.** Etude et simulation de l'évapotranspiration (ETP) par l'analyse en composantes principales (ACP). *ICID Journal*. **46** (2): 45-59.

13. **Dubey, S. C. & Singh, S. R. 2008.** Virulence analysis and oligonucleotide fingerprinting to detect diversity among Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing chickpea wilt. *Mycopathologia*, **165**: 389-406.

14. **Dubey, S. C., Suresh, M. & Singh, B. 2007.** Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biolo. Contr.* **40**: 118-127.

15. **Elena, K. & Pappas, A. C. 2002.** Pathogenicity and vegetative compatibility of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in Greece. *J. Phytopathol.* **150**: 495-499.
16. **Elena, K. & Pappas, A. C. 2006.** Race distribution, vegetative compatibility and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* isolates in Greece. *J. Phytopathol.* **154**: 250-255.
17. **Glass, N. L. & Kuldau, G. A. 1992.** Mating type and vegetative incompatibility in filamentous Ascomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**: 201-224.
18. **Goud, J. C. & Termorshuizen, A. J. 2002.** Pathogenicity and virulence of the two Dutch VCGs of *Verticillium dahliae* to woody ornamentals. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**: 771-782.
19. **Gupta, O. M., Khare, M. N. & Kotasthane, S. R. 1986.** Variability among six isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* causing vascular wilt of chickpea. *Indian Phytopath.* **39**: 279-281.
20. **Haddadi, F. 1992.** Contribution à l'étude de l'interaction nematode-*Fusarium oxysporum* Schelcht emend snyd et Hans f. sp. *ciceri* (Padwik) snyd et Hans dans l'expression de la fusariose du pois chiche. Mémoire ing. Agro. INA. El-Harrach. 102 p.
21. **Halila, M. H. & Strange, R. N. 1996.** Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* race 0. *Phytopathol Mediterr.* **35**: 67-74.
22. **Haware, M. P. 1990.** *Fusarium* wilt and other important diseases on chickpea in the mediterranean area. Options méditerr. Ser. Séminar 9: 61-64.

23. **Haware, M. P. 1993.** *Fusarium* diseases of crops in India. *Indian Phytopath.* **46**: 101-109.
24. **Haware, M. P., Nene, Y. L. & Mathur, S. B. 1986.** Seed borne diseases of chickpea. From the Danish government Institute of seed pathology for developing countries, Copenhagen. Denmark. *Technical bull.* 1: 32 p.
25. **Hervàs, A., Trapero-Casas, J. L. & Jiménez-Díaz, R. M. 1995.** Induced resistance against *Fusarium* wilt of chickpea by nonpathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and nonpathogenic isolates of *F. oxysporum*. *Plant dis.* **79**: 1110-1116.
26. **Jiménez-Gasco, M. M., Navas-Cortés, J. A. & Jiménez-Díaz, R. M. 2004.** The *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem : a case study of the evolution of plant pathogenic fungi into races and pathotypes. *Internat. Microbiol.* **7** (2): 95-104.
27. **Jiménez-Gasco, M. M., Pérez-Artès, E. & Jiménez-Díaz, R. M. 2001.** Identification of pathogenic races 0, 1 B/C, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Eur j. plant pathol.* **107**: 237-248.
28. **Kaiser, W. J., Alcalá-Jiménez, A. R., Hervàs-Vargas, A., Trapero-Casas, J. L. & Jiménez-Díaz, R. M. 1994.** Screening of wild *Cicer* species for resistance to races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Dis.* **78**: 962-967.
29. **Kapoor, S. K., Sugha, S. K. & Singh, B. M. 1992.** A new virulence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Indian Phytopath.* **48**: 458-460.
30. **Katan, T. 1999.** Current Status of Vegetative Compatibility Groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica.* **27** (1): 1-14.

31. **Katan, T., Katan, J., Gordon, T. R. & Pozniak, D. 1994.** Physiologic races and vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology*. **84**:153-156.
32. **Kelly, A. G., Alcalá-Jiménez, A. R., Bainbridge, B. W., Heale, J. B., Pérez-Artés, E. & Jiménez-Díaz, R. M. 1994.** Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology* **84**: 1293-1298.
33. **Kelly, A. G., Bainbridge, B. W., Heale, J. B. & Pérez-Artés, E. 1998.** In planta-polymerase-chain-reaction detection of the wilt-inducing pathotype of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **52**: 397-409
34. **Leslie, J. F. 1993.** Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**: 127-150.
35. **Leslie, J. F., Summerell, B. A. 2006.** The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell publishing professional, State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA 369 p.
36. **Maatougui, M. E. H., Bouznad, Z. & Labdi, M. 1996.** Chickpea in Algeria, In: Adaptation of chickpea in the west Asia and North Africa region. Edit by Saxena, N. P., Saxena, M. C., Johanson, C., Virmai, S. M. & Harris, H. 89-99.
37. **Messiaen, C. M. & Cassini, R. 1968.** La systématique des *Fusarium*. *Ann. Epiphyties.* **19** (3) : 387-454.
38. **Morjane, H. & Harrabi, M. 1995.** Détection et analyse de la variation génétique chez le pois chiche par les empreintes génétiques. *Revue de l'I. N. A. T.* **10** (1) : 65-73.

39. **Muehlbauer, F. J. & Tullu, A. 1997.** *Cicer arietinum* L. *New crop Fact SHEET*. 6 p.
40. **Navas-Cortés, J. A., Alcalà-Jiménez, A. R., Hau, B. & Jiménez-Díaz, R. M. 2000.** Influence of inoculum density of races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of *Fusarium* wilt in chickpea cultivars. *Eur. J. plant pathol.* **106**: 135-146.
41. **Neergaard, P. 1979.** Seed pathology. Published by the MACMILLAN press LTD : London and basingstoke. Vol. 1. 835 p.
42. **Nene, Y. L. 1980.** Diseases of chickpea. Proceeding international work shop on chickpea improvement. ICRISAT, 28 Feb-2 Mai 1979 Hyderabad, A. P., India. 171-178.
43. **Nene, Y. L., Haware, M. P. & Reddy, M. V. 1978.** Diagnosis of some wilt like disorders of chickpea (*Cicer arietinum* L.). information Bulletin n° 3- Patancheru, A. P. 502 324, India: ICRISAT. 44 p.
44. **Ouinten, M. 1996.** Diversité et structure génétiques des populations Algériennes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis*, agent de la fusariose vasculaire (Bayoud) du palmier dattier. Thèse doctorat. Université de Montpellier. 144 p.
45. **Pérez-Artés, E. & Tena, M. 1989.** Pectic enzymes from two races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Enzyme production in culture and enzymatic activity on isolated chickpea cell walls. *J. Phytopathology* **124** : 39-51.
46. **Pérez-Artés, E., Roncero, M. I. G. & Jiménez-Díaz, R. M. 1995.** Restriction Fragment Length polymorphism analysis of the mitochondrial DNA of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *J. Phytopathol.* **143**: 105-109.

47. **Puhalla, J. E. 1984.** A visual indicator of heterokaryosis in *Fusarium oxysporum* from celery. *Can. J. Bot.* **62**: 540-545.
48. **Puhalla, J. E. 1985.** Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* **63**: 179-183.
49. **Roebroek, E. J. A. & Mes, J. J. 1998.** Physiological races and vegetative compatibility groups within *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. *Neth. J. Pl. Path.* **98**: 57-64.
50. **Rubio, J., Hajj-Moussa, E., Khrrat, M., Moreno, M. T., Millan, T. & Gil, J. 2003.** Two genes and linked RAPD markers involved in resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 0 in chickpea. *Plant Breed.* **122** : 188—191.
51. **Santoni, S., Faivre-Rampant, P., Prado, E. & Prat, D. 2000.** Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cahiers Agricultures.* **9** : 311-327.
52. **Sayoud, R., Ezzahiri, B. & Bouznad, Z. 1999.** Les maladies des légumineuses alimentaires, in : Les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires au Maghreb. Guide pratique. ITGC Algérie. 41p.
53. **Sharma, K. D. & Muehlbauer F. J. 2007.** *Fusarium* wilt of chickpea: physiological specialisation, genetics of resistance and resistance gene tagging. *Euphytica.* **157**: 1-14.
54. **Sharma, K. D., Chen, W. & Muehlbauer, F. J. 2005.** Genetics of chickpea resistance to five races of *Fusarium* wilt and a concise set of race differentials for *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Dis.* **89**: 385-390.

55. **Sharma, K. D., Winter, P. & Kahl, G. 2004.** Molecular mapping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 3 resistance gene in chickpea. *Theor. Appl. Genet.* **108**:1243–1248
56. **Sivan, A. & Chet, L. 1986.** Biological control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and musk melon by *Trichoderma harzianum*. *J. phytopathol.* **116**: 39-47.
57. **Sivaramakrishnan, S., Kannan, S. & Singh, S. D. 2002.** Genetic variability of *Fusarium* wilt pathogen isolates of chickpea (*Cicer arietinum* L.) assessed by molecular markers. *Mycopathologia.* **155**: 171-178.
58. **Stasaïd, A. 1991.** Contribution à l'étude de la variabilité du pouvoir pathogène de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (Padwik) emend snyd et Hans et résistance variétale du pois chiche au flétrissement. Mémoire ing. Agro. INA. El-Harrach. 174 p.
59. **Trapero-Casas, A. & Jiménez-Díaz, R. M. 1985.** Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. *Phytopathology* **75**: 1146-1151.
60. **Tullu, A., Kaiser, W. J., Kraft, J. M. & Muehlbauer, F. J. 1999.** A second gene for resistance to race 4 of *Fusarium* wilt in chickpea and linkage with a RAPD marker. *Euphytica.* **109**: 43-50.
61. **Weigand, F., Baum, M. & Udupa, S. 1993.** DNA Molecular Marker Techniques. Technical manual n° 20. ICARDA, Aleppo, Syria. 21 p.
62. **Zine, F. 1997.** Situation de la culture du pois chiche en Algérie. Actes 1^{ères} journées Sc. INRA Algérie : 90-97.

ANNEXE

Annexe 1

Milieu PDA

Composé	Quantité
Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
H ₂ O q. s. p.	1000 ml

Milieu liquide pour la production du mycélium

Composé	Quantité
Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
H ₂ O q. s. p.	1000 ml

Stérilisation à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C

Annexe 2

Milieux de culture utilisés pour la compatibilité végétative

Le milieu de base c'est le milieu qui nous a servi à la préparation de tous les milieux synthétiques utilisés dans la technique de compatibilité végétative

Milieu de base

Composés	Quantité
Saccharose	30 g
KH_2PO_4	1 g
KCl	0,5 g
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{Fe SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	10 g
Agar	20 g
Solution d'oligo-elements	0,2 ml
H_2O q. s. p.	1000 ml

Solution d'oligo-éléments

Composés	Quantité
Acide citrique	5 g
$\text{Zn SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	5 g
$\text{Fe (NH}_4)_2\text{SO}_4, 6\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{Cu SO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	250 mg
$\text{Fe SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	4,75 g
$\text{Mn SO}_4, \text{H}_2\text{O}$	50 mg
H_3BO_3	50 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	50 mg
H_2O q. s. p.	100 ml

Milieu Minimum (MM)

Composés	Quantité
Milieu de base	1000 ml
Na NO ₃	2 g

Milieu de sélection (MMC)

Composés	Quantité
Milieu de base	1000 ml
L-Asparagine	1,6 g
KClO ₃	15 g
Na NO ₃	2 g

Milieu nitrite

Composés	Quantité
Milieu de base	1000 ml
Na NO ₂	0,5 g

Milieu hypoxanthine

Composés	Quantité
Milieu de base	1000 ml
Hypoxanthine	0,2 g

Milieu de conservation

Composés	Quantité
Milieu de base	1000 ml
L-Asparagine	1,6 g
Na NO ₃	2 g

Annexe 3 Solution pour les analyses moléculaires

CTAB X 1 pour lyse du mycélium

Composés	Quantité
CTAB 1% (w/v)	1 g
Tris 50 mM, pH 8	5 ml Tris 1 M pH 8
EDTA 10 mM pH 8	2 ml EDTA 0,5 M pH 8
NaCl 0,7 mM	14 ml Na Cl 5 M
H ₂ O stérilisée q. s. p.	100 ml

Tampon T. E. x 1 (Tris-EDTA) Tris 10 mM, EDTA 1mM

Composés	Quantité
Tris base 1 M pH 8	12, 11 g
EDTA 0,5 M pH 8	0,0372 g
H ₂ O stérilisée q. s. p.	100 ml

Tampon TAE x 1

Composés	Quantité
Tris base 1 M pH 8	4, 84 g
Acide acétique glacial	1,14 ml
EDTA 0,5 M pH 8	2 ml
H ₂ O stérilisée q. s. p.	100 ml

Tampon de charge : (loading buffer)

Composés	Quantité
Bleu de Bromophénol	0,25 g
Glycérol	30 ml
H ₂ O stérilisée q. s. p.	100 ml

Préparation des mini gels d'agarose

1. préparer un gel d'agarose un 1%, soit 0,5 g d'agarose dans 50 ml de TAE x1.
2. Mettre à bouillir puis laisser refroidir à 60° C.
3. Coller le ruban adhésif aux deux extrémités de la cuvette.
4. Placer le peigne pour obtenir les différents puits dans la cuvette.
5. Ajouter 5 µl de bromure d'etidium (à 10mg/ml).
6. Couler le gel refroidi à 60° C tout en tenant le peigne.
7. Enlever les bulles d'air à l'aide d'une pipette pasteur.
8. Après solidification du gel, enlever doucement les rubans ainsi que le peigne, puis placer la cuvette dans la cuve de l'électrophorèse et ajouter du TAE x1 afin de couvrir le gel.

Protocole d'extraction basé sur l'utilisation de CTAB

1. Broyer 4 g de mycélium fongique dans l'azote liquide jusqu'à obtenir une poudre fine.
2. Rajouter 1ml du tampon CTAB (100 ml CTAB +100 ul mercapto- éthanol) préchauffé à 65°C et incuber à la même température pendant 1h, puis incuber les tubes pendant 5mn au congélateur.
3. Rajouter 900 ul de chloroforme alcool isoamylique (24 : 1), agiter doucement avec un agitateur pendant 20 mn, et centrifuger à 4 000 rpm pendant 10 mn.
4. Transférer la phase aqueuse dans un autre tube, puis répéter l'étape 3
5. Transférer le surnageant dans un autre tube de 2 ml.
6. Rajouter 2/3 volume (660 ul) d'isopropanol froid (-20°C), puis agiter doucement pour précipiter les acides nucléiques et incuber pendant 30mn au congélateur.
7. Centrifuger à 4 000 rpm, puis éliminer le surnageant en gardant la pelote d'acides nucléiques et rajouter 1ml d'éthanol froid (75%).
8. Centrifuger encore une fois à 4 000 rpm et répéter l'étape de l'éthanol.
9. Dissoudre l'ADN dans 50 ul de TE et conserver à 4°C.

Annexe 4

Tableau 1 : Indice moyen de la maladie au 20^{ème} jour après le semis

Cultivars	JG-62	JG-74	WR-315	CPS-1	BG-212	ILC-3279
Isolats						
O-93	0	1,12	0,22	1,08	1,13	0
S-93	0,16	0	1,18	0	0,09	1,01
K-93	0,95	0,31	0,7	0,72	0	0,63
I-99	0,72	0,14	0,67	1,12	0,82	1,13
G-93	0,37	0,17	0	0,83	0,55	0
E-00	0	0,54	0,8	0	1,35	1,32
O-10/01	0	0,14	0	0,71	0,23	0,63
O-04/02	0,28	0	0	0,16	0,11	0
O-10/02	0,89	0,4	1,35	0,91	0,16	0,14
SS-03	0,41	0,21	0,26	0	0	1,33
IT-03	0,62	0,52	0	0,34	0,17	0,67
Témoin	0	0	0,2	0	0	0,01

Tableau 2 : Indice moyen de la maladie au 40^{ème} jour après le semis

Cultivars	JG-62	JG-74	WR-315	CPS-1	BG-212	ILC-3279
Isolats						
O-93	1,53	1,48	1,42	1,65	1,4	2,79
S-93	1,32	1,38	1,23	1,63	1,18	1,81
K-93	2,04	1,74	1,75	1,88	1,62	2,65
I-99	1,71	1,15	2,18	1,46	2,05	2,85
G-93	2,41	1,29	2,32	1,73	1,13	2,33
E-00	2,18	1,82	1,18	1,58	1,02	1,19
O-10/01	1,19	1,25	2,01	1,61	1,19	1,84
O-04/02	1,13	1,17	1,19	1,12	1,17	1,58
O-10/02	2,48	2,91	3,08	1,81	1,85	2,97
SS-03	2,05	1,35	1,02	1,13	1,09	2,33
IT-03	1,12	1,42	1,23	1,62	1,13	2,18
Témoin	0,17	0,16	0,25	0,22	0,27	0,34

Tableau 3 : Indice moyen de la maladie au 60^{ème} jour après le semis

Cultivars	JG-62	JG-74	WR-315	CPS-1	BG-212	ILC-3279
Isolats						
O-93	1,62	1,75	1,47	1,52	1,45	2,67
S-93	1,47	1,72	1,31	1,56	1,22	1,85
K-93	2,19	3,09	1,92	1,94	1,73	3,04
I-99	1,84	1,91	2,26	2,35	2,18	2,61
G-93	2,51	1,95	2,61	1,87	2,21	2,58
E-00	2,36	1,57	1,25	1,23	1,03	1,9
O-10/01	1,45	1,59	2,13	1,34	1,14	3,12
O-04/02	1,15	1,45	1,51	1,15	1	1,18
O-10/02	2,77	3,21	3,24	3,18	1,82	3,33
SS-03	2,15	1,83	1,33	1,11	1,19	2,82
IT-03	1,19	1,63	1,36	1,62	1,23	2,29
Témoin	0,45	0,38	0,22	0,25	0,54	0,66

Valeur en gras : symptôme de flétrissement

Tableau 4 : Dénombrement des fragments RAPD des 14 isolats

Isolats															
Bandes	K-	E-	IT-	SS-	I-	S-	O-	O-	O-	O-	G-				
OPF10	93	00	03	03	99	93	93	10/01	04/02	10/02	93	FB	Fpp	FH	
1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
3	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
6	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
7	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
8	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Isolats															
Bandes	K-	E-	IT-	SS-	I-	S-	O-	O-	O-	O-	G-				
OPI01	93	00	03	03	99	93	93	10/01	04/02	10/02	93	FB	Fpp	FH	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
6	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
8	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
10	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
12	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
13	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

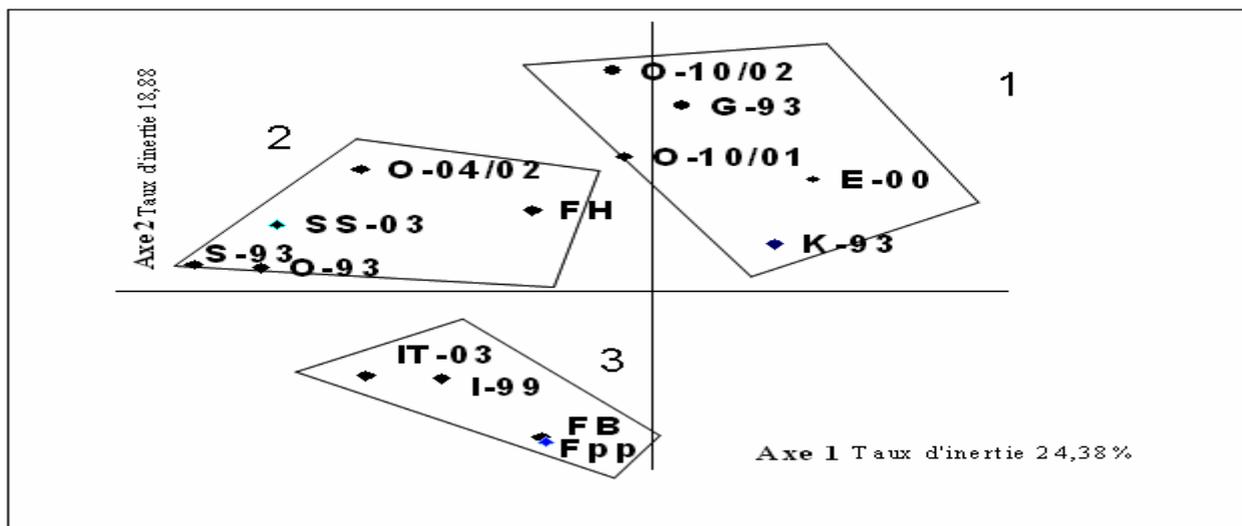


Figure 25: ACP relative aux profils RAPD des différents isolats obtenus avec les deux amorces OPF 10 et OPI 01 sur le plan 1-2

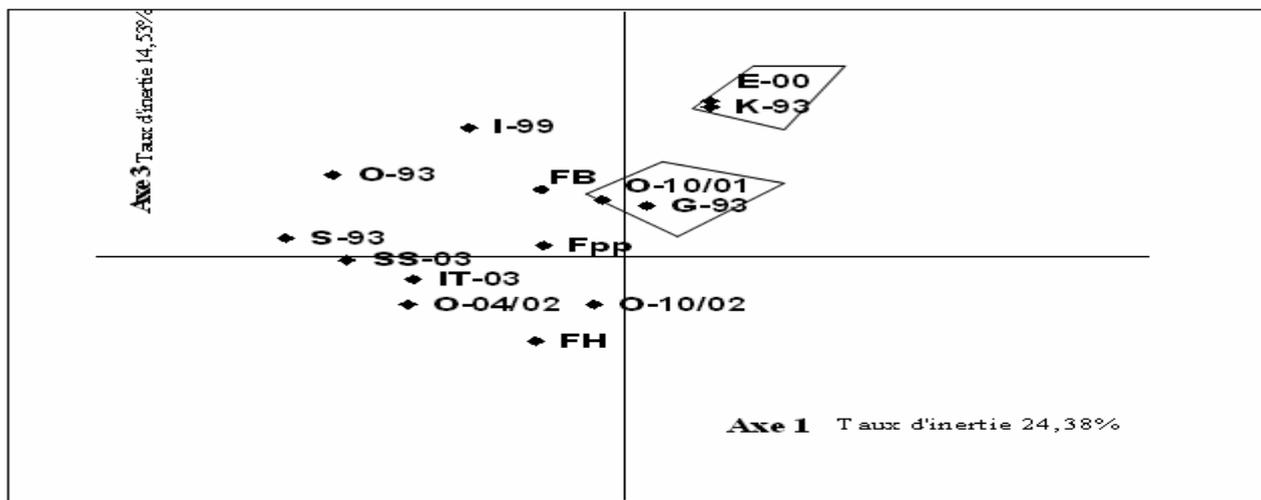


Figure 26: ACP relative aux profils RAPD des différents isolats obtenus avec les deux amorces OPF 10 et OPI 01 sur le plan 1-3

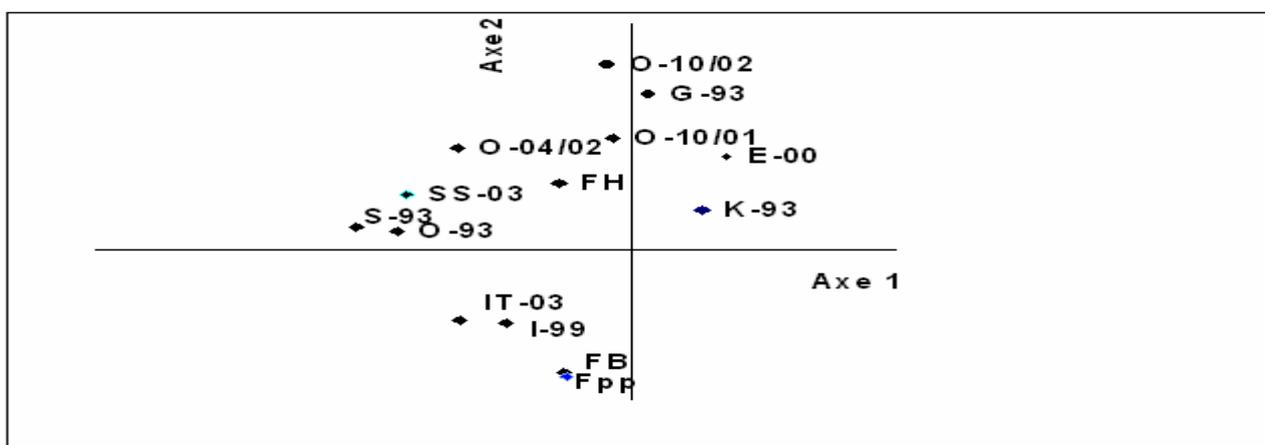


Figure 27: ACP relative aux profils RAPD des différents isolats obtenus avec les deux amorces OPF 10 et OPI 01 sur le plan 2-3

Résumé

Le *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* agent de flétrissement de pois chiche, montre une variabilité pathologique importante. Celle-ci est représentée par huit races physiologiques répartis à travers le monde. Différentes techniques d'analyse ont été utilisées afin d'estimer la diversité génétique de 11 isolats de *F. o. c.* obtenus de différentes régions de culture de pois chiche en Algérie, par des études pathologiques, moléculaires et compatibilité végétative. A titre de comparaison, nous avons inclus dans notre analyse 3 isolats appartenant à d'autres espèces du genre *Fusarium* pour les deux dernières analyses. L'étude pathologique basée sur l'inoculation artificielle de 6 cultivars de pois chiche, a montré une variabilité entre les isolats de *F. o. c.* testés, et a permis de distinguer les isolats O-10/02, O-10/01, K-93, I-99 et G-93 ayant provoqué le symptôme de flétrissement. Par ailleurs l'isolat O-10/02 s'est révélé le plus agressif, alors que les deux isolats O-04/02 et S-93 se sont montrés les moins agressifs. L'étude moléculaire basée sur l'RAPD en utilisant les 2 amorces OPF-10 et OPI-01, a également montré une variabilité remarquable. Cette technique a permis de différencier deux groupes d'isolats : le groupe comprenant les isolats SS-03, O-93 et S-93, induit le symptôme de jaunissement. Le deuxième groupe renferme les deux isolats O-10/01 et G-93, ayant induit le symptôme de flétrissement. Ce résultat confirme dans une certaine mesure les résultats de l'étude pathologique. En revanche, l'étude de la compatibilité végétative n'a pas permis de mettre en évidence une quelconque compatibilité entre les isolats.

Mots clés : *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, variabilité génétique, variabilité pathologique, variabilité moléculaire, RAPD, compatibilité végétative.

Abstract

Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris* agent of chickpea wilt shows a significant pathological variability. It is represented by eight physiological races worldwide. Different analysis techniques were used to estimate the genetic diversity of 11 isolates of *F. o. c.* obtained from different growing regions of chickpea in Algeria, by pathological, molecular and vegetative compatibility studies. For comparison, we included in our analysis 3 isolates belonging to other species of the genus *Fusarium* in the last two tests. The pathological study based on artificial inoculation of 6 cultivars of chickpea, showed variability between isolates of *F. o. c.* tested, and helped to distinguish isolates O-10/02, O-10/01, K-93, I-99 and G-93 which caused the wilting. Also isolate O-10/02 proved more aggressive, while the two isolates O-04/02 and S-93 were the least aggressive. The study based on molecular ARPD using 2 primers OPF-10 and OPI-01, also showed a remarkable variability. This technique allowed distinguishing two groups of isolates: the group containing isolates SS-03, O-93 and S-93, induces symptoms of yellowing. The second group contains the two isolates O-10/01 and G-93, which induces wilting. This result confirms to some extent the results of pathological study. However, the study of vegetative compatibility failed to identify any compatibility between isolates

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, genetic variability, pathologic variability, molecular variability, RAPD, vegetative compatibility

ملخص

Fusarium oxysporum f.sp. *ciceris* مسبب مرض ذبول الحمص يظهر تنوع معتبر. هذا الفطر يضم ثمانية سلالات فيزيولوجية منتشرة عبر العالم. عدة تقنيات تحليل قد استخدمت من أجل تقدير التنوع الجيني لـ 11 عزلة تم الحصول عليها من مختلف مناطق زراعة الحمص في الجزائر *F. o. c.*, عن طريق الدراسات المرضية, الدراسات الجزيئية و دراسة التوافق النباتي. للمقارنة تم إدراج 3 عزلات من أصناف أخرى من جنس *Fusarium*. ضمن الدراستين الأخيرتين. الدراسة المرضية عن طريق inoculation لـ 6 أصناف من الحمص أظهرت تباين بين العزلات محل الدراسة بحيث أدت إلى تمييز العزلات O-10/02, O-10/01, K-93, I-99 و G-93 والتي سببت أعراض الذبول. من جانب آخر العزلة O-10/02 تبدو الأكثر عدوانية بينما العزلات O-04/02, S-93 تظهران على أنهما الأقل عدوانية. الدراسة الجزيئية المستندة على تقنية RAPD أظهرت بدورها تباين ملحوظ. هذه التقنية سمحت بتمييز مجموعتين من العزلات: الأولى تحتوي على العزلات SS-03, O-93 و S-93 لـ *F. o. c.* المتسببة في أعراض الاصفرار, المجموعة الثانية تضم العزلات O-10/01 و G-93 المتسببة في أعراض الذبول, هذه النتيجة تتفق مع الدراسة المرضية. غير أن دراسة التوافق النباتي لم تنجح في تحديد أي توافق بين العزلات.

الكلمات الرئيسية: *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, التنوع الجيني, التنوع المرضي, التنوع الجزيئي, RAPD, التوافق النباتي.