

***Etude de la diversité génétique des  
espèces de *Phoma* spp. inféodées aux  
*Fabaceae****

**Présenté par :Melle GHIAT Nawel**

Directeur de thèse :MrBOUZNAD Z. (Professeur, ENSA Alger)  
Année Universitaire 2010/2011

Président :Mr ABDELGUERFI A. (Professeur, ENSA Alger) Examineurs :MmeLOUANCHI M.  
(Maître de conférences, ENSA Alger) MrKEDAD A. (Chargé de cours, ENSA Alger) Mr GUEZLANE A.  
(Maître de conférences, ENSA Alger)



# Table des matières

Dédicace . . .	5
Remerciement . . .	6
Liste des abréviations . . .	7
Résumé . . .	8
Summary . . .	9
صن علم . . .	10
Introduction générale . . .	11
Chapitre I Données bibliographiques . . .	13
1. Données bibliographique . . .	13
1.1. Caractères généraux et importance économique des <i>Fabaceae</i> . . .	13
1.2. Problèmes phytosanitaires des <i>Fabaceae</i> . . .	14
1.3. Présentation des principaux agents d'antracnose et de pourriture à <i>Phoma</i> spp. et à <i>Ascochyta</i> spp. . . .	14
1.4. Diversité phénotypique et génétique des <i>Phoma</i> spp. et <i>Ascochyta</i> spp. des <i>Fabaceae</i> . . .	18
1.5. La spécificité parasitaire : . . .	21
Chapitre II Matériel et méthodes . . .	23
2. Matériels et méthodes . . .	23
2.1. Matériel fongique . . .	23
2.2. Matériel végétal . . .	24
2.3. Caractérisation morphologique des conidies . . .	24
2.4. Etude de la compatibilité végétative des isolats . . .	24
2.5. Caractérisation des isolats par RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) . . .	26
2.6. Etude de la spécificité parasitaire . . .	28
Chapitre III Résultats et discussions . . .	30
3. Résultats et discussions . . .	30
3.1. Description des symptômes sur bersim et pois . . .	30
3.2. Caractérisation morphologique des isolats : septation et taille des conidies . . .	31
3.3. Analyse des isolats par la compatibilité végétative . . .	38
3.4. Analyse du polymorphisme génétique des isolats de <i>Phoma</i> spp. et <i>Ascochyta</i> spp. par RAPD . . .	43
3.5. Spécificité parasitaire des isolats de <i>Phoma</i> et <i>Ascochyta</i> à l'égard de quelques espèces de <i>Fabaceae</i> . . .	54
Conclusion générale . . .	66
Références bibliographiques . . .	68
ANNEXE . . .	76
Annexe 1 . . .	76
Annexe 2 . . .	77
Annexe 3 . . .	78
Annexe 4 . . .	80

Annexe 5 : . . .	81
Annexe 6 : . . .	82
Annexe 7 : . . .	83
Annexe 8 : . . .	84

## Dédicace

*A la mémoire de mon Oncle Brahim Hadj Smail La terre tourne et continue de tourner mais sans toi Khalou*

## Remerciement

Je remercie Mr BOUZNAD, de m'avoir encadré et encouragé tout au long de ce mémoire. Sa patience, sa compréhension, ses enseignements et ses suggestions m'ont été très précieux.

Mes remerciements vont également aux membres de jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté d'examiner ce travail. Mr. ABDELGUERFI, pour l'honneur qu'il me fait de présider cet honorable jury de soutenance. Mme. LOUANCHI, d'avoir aimablement accepté d'examiner ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent à Mr. KEDAD, pour l'intérêt qu'il a bien voulu accorder à mon travail en acceptant de l'examiner.

Je remercie Mr. GUEZLANE, pour ses conseils dont j'ai beaucoup bénéficié et d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie Mr Sellam du G. R. pour son aide dans les analyses statistiques ainsi que ses orientations dans la réalisation du dispositif expérimental.

J'adresse mes vifs remerciements à Mme. Boumediene, ses remarques judicieuses et ses discussions enrichissantes m'ont permis d'étayer certains points de ce mémoire.

Mes profonds respects et mes remerciements vont également à Fatima, Houda, Kenza, Fadela pour leurs encouragements, et tout le personnel du département Botanique.

Ce modeste travail a pu être mené à bien grâce à l'aide, aux conseils, et aux encouragements de nombreuses personnes qu'il m'est très agréable de les remercier. Salhi. N. Meamiche. H. Benhaddadi. K, Benslimane. H et Debbi. A, sa bienveillance a été un encouragement pour mener à terme cette étude.

En fin, c'est par un grand hommage à ma famille que je me permets de tourner cette page. Ma mère et mes sœurs ont supporté mon renoncement à tout (voire ma négligence de tout au profit de ce mémoire). Je leur demande pardon et les remercie infiniment de leurs efforts.

## Liste des abréviations

- **ADN**: Acide désoxyribonucléique
- **AFLP**: Amplified fragment length polymorphism
- **BET**: Bromure d'éthidium
- **DNTP**: 2'désoxynucléotide-5'triphosphate
- **DO**: Densité optique
- **EDTA**: Ethylène Diamine Tetra-Acetic-Acide
- **G3PD**: Glycéraldéhyde-3- Phosphate déshydrogénase
- **ITGC**: Institut Technique des Grandes Cultures
- **ITS**: Internal Transcribed Spacer
- **MMC**: Milieu minimum à base de chlorate
- **MM**: Milieu minimum
- **Pb**: Paires de bases
- **PCR**: Polymerase chain Reaction
- **PDA**: Potato Dextrose Agar
- **RAPD**: Randomly Amplified Polymorphic DNA
- **RFLP**: Restriction Fragment Length Polymorphism
- **SDS**: Sodium-Dodecyl-Sulfate
- **SNP**: Single Nucleotide Polymorphisme
- **SSR**: Simple Sequence Repeats
- **Tef1**: Translation elongation factor gene
- **TAQ polymerase**: Thermus aquaticus Polymerase DNA
- **TAE**: Tris Acétate EDTA
- **TE**: Tris EDTA
- **UPGMA**: Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average.
- **UV**: Ultra Violet.
- **VCG**: Vegetative Compatibility Groups

## Résumé

Les espèces appartenant au genre *Phoma* sont très redoutables sur les cultures des Fabacées alimentaires et fourragères. Elles provoquent de graves symptômes sur les parties souterraines et aériennes des plantes hôtes et sont souvent la cause de sérieuse baisse de rendement. L'identification de ces espèces et la connaissance de leur variabilité génétique ainsi que leur spécificité parasitaire sont nécessaires pour améliorer les méthodes de lutte. Différentes techniques ont été utilisées afin d'estimer la diversité génétique de 26 isolats de *Phoma* et d'*Ascochyta* obtenus de pois, pois chiche, luzerne, bersim et trèfle violet, par des études morphologiques, compatibilité végétative, moléculaire et spécificité parasitaire. La caractérisation morphologique des conidies a révélé une grande variabilité de par la taille et la septation des conidies des différents isolats étudiés. Par ailleurs, certains isolats présentent une morphologie des conidies et une spécificité parasitaire différente de celle des espèces de *Phoma* connues à savoir, *P. pinodella* et *P.m.var.medicaginis*. Ils se sont montrés très polyphages contrairement aux espèces d'*Ascochyta* qui montrent un degré élevé de spécificité. L'étude de la compatibilité végétative n'a pas permis de mettre en évidence une grande variabilité, 2 groupes ont été mis en évidence entre 7 isolats (groupe de *Phoma* et un autre de *Mycosphaerella*). En revanche le marqueur moléculaire RAPD a montré une variabilité remarquable des profils générés par l'ensemble des isolats de la collection. Il a été possible de différencier les principales espèces d'*Ascochyta* des Fabacées alimentaires d'une part, et de distinguer entre les deux espèces, *P. pinodella* et *P.m.var.medicaginis* d'autre part. Cette étude a confirmé la grande difficulté d'identification des espèces de *Phoma* qui sont souvent pathogènes sur plusieurs Fabacées et suggère l'existence d'au moins une espèce très polyphage différente des deux espèces de *Phoma* décrites habituellement et qui attaquent sévèrement le bersim.

**Mots clés :** *Phoma*, diversité génétique, variabilité morphologique, compatibilité végétative, spécificité parasitaire, variabilité moléculaire, RAPD.

## Summary

Species of the genus *Phoma* are very dangerous on the cultures of Fabaceae food and forage. They cause severe symptoms on the underground parts and aerial plant hosts and are often the cause of serious yield loss. The identification of these species and knowledge of their genetic variability and their host specificity are needed to improve control methods. Various techniques have been used to estimate the genetic diversity of 26 isolates of *Phoma* and *Ascochyta* obtained from peas, chickpea, alfalfa, berseem clover and by morphological studies, vegetative compatibility, molecular variability and host specificity. The morphological characterization of conidia revealed a great variability in size and septation of conidia of different isolates studied. Indeed, some isolates exhibit morphology of conidia and host specificity different from that of known species of *Phoma* namely *P. pinodella* and *P.m.var.medicaginis*. They were very polyphagous species of *Ascochyta* unlike that show a high degree of specificity. The study of vegetative compatibility has failed to demonstrate a high variability, two groups were found among seven isolates (*Phoma* group and one of *Mycosphaerella*). In contrast, the molecular marker RAPD showed a remarkable variability of the profiles generated by all isolates of the collection. It was possible to differentiate the main species *Ascochyta* of Fabaceae food on the one hand and the distinction between the two species, other *P.pinodella* and *P.m.var.medicaginis*. This study confirmed the great difficulty of identifying species that are often pathogen *Phoma* on several Fabaceae and suggests the existence of at least a highly polyphagous species different from the two species described of *Phoma* and severe attacks hardly berseem clover.

**Keywords:** *Phoma*, genetic variability, morphological variation, vegetative compatibility, host specificity, molecular variability, RAPD,

## ص خ لم

الأشواخ من جنس *Phoma* خطيرة للغاية على البقلات الغذائية و العلفية، إنها تسبب أعراض شديدة على الجزء السفلي (الجذور) و الجزء العلوي، و تسبب انخفاضاً ملموساً في الإنتاج. التعرف على أنواع الجنس و تحديد التنوع الجيني أضف إلى ذلك معرفة التخصص الطفيلي أمر ذات أهمية من أجل تحسين تقنيات مكافحة. عدة تقنيات تحليل قد استخدمت من أجل تمييز التنوع الجيني لـ 26 عزلة *Phoma* و *Ascochyta* تم الحصول عليها من البازلاء، الحمص، البرسيم. أظهرت دراسة الخصائص المرفولوجية ثباتاً كبيراً من حيث حجم و تركيز الأبواغ للعزلات المختلفة. في الواقع، بعض العزلات تحصل مرفولوجية الأبواغ و خصوصية المضيف مختلفة عن تلك المعروفة من *Phoma* و هي *P. pinodella* و *P. m. var. medicaginis*. و توجد عزلات متحادة اللواقح بشكل مختلف عن تلك التي تنتمي إلى *Ascochyta* التي تظهر درجة عالية من التخصص. دراسة التوافق النباتي لم تظهر تباين كبيراً. مجموعتين لـ 7 عزلات (مجموعة *Phoma* و *Mycospharella*). في المقابل أظهرت الدراسة الجزئية المستندة على تقنية RAPD بدورها تباين ملحوظ من خلال تحليل الملامح الأرييدية لمجموع العزلات المدروسة. كان من الممكن التقريب بين الأشواخ الرئيسية للبقلات الغذائية للجنس *Ascochyta* من جهة و التمييز بين النوعين *P. pinodella* و *P. m. var. medicaginis* من جهة أخرى. و أكدت هذه الدراسة على الصعوبة الكبيرة في تحديد الأشواخ *Phoma* التي غالباً ما تكون ممرضة على البقوليات، و يقترح وجود ما لا يقل على نوع واحد من هذا الجنس غير الأشواخ الأخرى الواسعة الإشتغال على البقوليات و يحدث هذا النوع الجديد إصابات كبيرة على البرسيم.

**الكلمات الدلالية:** RAPD، التنوع الجيني، التنوع المرفولوجي، التوافق النباتي، الخاصية المضيفة، التنوع الجزيئي، *Phoma*

---

# Introduction générale

En terme de superficie et de production, les *Fabaceae* constituent la seconde famille des plantes cultivées après les céréales ; leur importance varie entre 22 et 45% de la superficie cultivée dans le monde (Tivoli & al, 2006).

Les *Fabaceae* alimentaires et fourragères présentent un intérêt tout à fait particulier pour l'agriculture, en raison des caractères biologiques de leurs racines qui ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique grâce aux bactéries symbiotes d'une part (Graham & Vance ; 2003), et leur teneur élevée en protéines d'autre part.

Les légumineuses alimentaires, représentent la principale source de protéines dans les pays en développement. De ce fait, elles permettent dans une certaine mesure de corriger les carences en protéines animales et le déséquilibre alimentaire des populations démunies. Les légumineuses fourragères jouent un rôle important dans le développement de la production animale (viande et lait) ; elles constituent l'alimentation de base pour le bétail.

En Algérie, malheureusement, la production en légumineuses fourragères et alimentaires est très faible. Ce qui explique que les besoins de la population en lait, viande et légumineuses alimentaires sont couverts principalement par les importations. L'Algérie, reste tributaire à 75% des importations de ses besoins, ce qui ne répond pas à une demande qui n'a pas cessé d'augmenter au cours de ces dernières années (Zaghouane & al 2000 ; Hamadache, 2003 ; Abdelgherfi & Laouer, 2003 ; Amroune & al, 2007).

A cet effet, améliorer la production animale d'une part, et assurer une sécurité alimentaire d'autre part, passent obligatoirement par le développement de la productivité des *Fabaceae*. Ces dernières, peuvent être intégrées dans des programmes de développement et de réhabilitation afin d'améliorer la performance de ces cultures et de répondre à la demande du consommateur en qualité et en quantité.

Malgré l'importance de la demande des *Fabaceae* dans le monde, les rendements de ces cultures n'ont que très peu progressé en comparaison aux céréales. Les maladies fongiques notamment celles causées par les espèces appartenant aux genres *Phoma* et *Ascochyta* qui prévalaient pendant plusieurs années consécutives en sont l'un des principaux facteurs limitants.

Au sein des genres *Phoma* et *Ascochyta*, sont classées un certain nombre d'espèces phytopathogènes redoutables inféodées aux *Fabaceae* fourragères et alimentaires. Ces espèces induisent de très graves dégâts sur les divers organes de ces plantes, affectant par conséquent le rendement et la qualité des récoltes.

Il se trouve que le genre *Phoma* est très proche morphologiquement du genre *Ascochyta*, ce qui rend très difficile la distinction de ces deux groupes de pathogènes. La détermination des maladies causées par ces champignons, par simple description des symptômes reste donc aléatoire, en raison de leur similitude. De même, une détermination sur la base des caractères morphologiques et culturaux n'est pas toujours facile, ajoutée à cela une spécificité mal établie. Tout cela, explique la confusion entre les deux genres (Bouznad & al ., 1995 ; Bouznad & Corbière, 1998 ; Irinyi, 2009). Leur complexité taxonomique complique l'identification des différentes espèces en cause, aboutissant à un

grand nombre de synonymes partagés entre certaines espèces, et dénomination différentes attribuées à un même pathogène (Aveskamp & al ., 2008).

A cet effet, une détermination fiable des pathogènes en cause, par des critères plus précis de leur variabilité génétique et leur spécificité d'hôte, s'avère une étape indispensable. Cette dernière permet de mettre en place des programmes de lutte adéquats, vu l'importance des dégâts et les pertes occasionnées par les pathogènes appartenant à ces deux genres, partout où l'on cultive les Fabacées, y compris en Algérie.

Différents travaux de recherche ont été menés en vue de mieux connaître ces pathogènes et c'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude. L'objectif principal est d'évaluer la variabilité génétique d'une collection d'isolats de *Phoma* isolés de plusieurs espèces de *Fabaceae*. Par ailleurs, la présence de symptômes appartenant à ce groupe de pathogènes au niveau de la culture de bersim à la station ITGC (Oued S'mar) depuis plusieurs années, nous a amené à nous intéresser particulièrement à identifier l'agent pathogène responsable de cette maladie.

Les critères choisis pour cette étude sont:

- Une caractérisation morphologique des isolats
- Une étude de la compatibilité végétative des isolats. Même si, très peu d'études de compatibilité végétative sur les espèces de *Phoma* et d'*Ascochyta* sont rapportées dans la littérature, il semble que cette approche génétique pourrait apporter beaucoup d'informations supplémentaires sur l'identification ainsi que la diversité génétique de ces espèces dont la taxonomie constitue une véritable ambiguïté.
- Une caractérisation moléculaire des isolats, par RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) en utilisant deux amorces.
- Une étude de la spécificité parasitaire de quelques isolats de la collection, vis-à-vis de plusieurs espèces de *Fabaceae* (bersim, luzerne, vesce, trèfle Violet, pois, pois chiche) par inoculation artificielle

---

# Chapitre I Données bibliographiques

## 1. Données bibliographique

### 1.1. Caractères généraux et importance économique des *Fabaceae*

---

La famille des *Fabaceae* appartient à l'ordre des Fabales, dont les espèces appartenant à cette famille se caractérisent par leur structure florale spécifique ayant des fleurs à cinq pétales disposées en papillon, d'où leur ancienne appellation « Les *Papilionaceae* » (Simpson, 2006).

Elle compte 20 000 espèces et réunit d'importantes espèces à graines alimentaires, fourragères et forestières (Gepts & al, 2005). Les *Fabaceae* occupent près de 180 millions d'hectares soit 12 à 15% de la superficie des terres arables à l'échelle mondiale (F.A.O, 2007).

Les *Fabaceae* à grosses graines utilisées dans l'alimentation humaine comprennent le petit pois, le haricot, le pois chiche, la lentille et la fève. Elles constituent la principale source de protéines disponibles dans les pays en développement (Zaghouane & al, 2000). Les grains contiennent généralement entre 20 et 30% de protéines et sont particulièrement riches en lysine. Les *Fabaceae* comprennent également la majorité des plantes fourragères à savoir les luzernes, les trèfles, la vesce, la gesse, le mélilot et le sainfoin, qui constituent une base importante de l'alimentation animale, en raison de leur faible coût et de leurs qualités nutritives (Russelle, 2001).

Les caractéristiques biologiques des *Fabaceae* suscitent également un intérêt certain notamment en raison de leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique par les bactéries symbiotiques des genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Allorhizobium* (Zakhia & de Lajudie In Abdelguerfi-Laouar, 2005). Ce caractère permet de rentabiliser les cultures antérieures en enrichissant le sol en azote (Labdi, 1991). Elles sont considérées également comme des espèces épuratrices de nitrates par leur capacité à capter l'azote en profondeur (Mauries & Paillat, 1997 ; Boillon & Roux, 1996).

En plus des bénéfiques qu'elles apportent pour l'alimentation humaine, animale et pour l'environnement, les *Fabaceae* peuvent être utiles dans diverses industries chimiques, comme le plastique biodégradable, l'huile, le biodiésel, les colorants, la gomme, le textile et le papier (Graham & Vance, 2003).

En Algérie, les *Fabaceae* fourragères participent peu à l'alimentation du cheptel. Les espèces cultivées se limitent à la luzerne, le bersim et la vesce en association avec les graminées (Abdelguerfi & Laouar, 2003). De plus, la production des *Fabaceae* alimentaire ne couvre pas les besoins de la population en produits alimentaires. Cependant, il y a eu un regain d'intérêt ces dernières années pour ces cultures. D'ailleurs, plusieurs espèces ont fait l'objet de divers travaux d'amélioration et d'études de comportement des variétés, telles que la luzerne. Par ailleurs, Chaabena & al (2004) ; Rahal-Bouziane & al (2003) et Rahal-Bouziane (2005) ont pu démontrer la facilité d'installation de cette espèce pérenne

et leurs travaux ont permis de vérifier la résistance à la sécheresse de quelques variétés de luzerne dans les oasis algériennes.

## 1.2. Problèmes phytosanitaires des *Fabaceae*

---

Les cultures de *Fabaceae* alimentaires et fourragères sont sujettes aux attaques de nombreux pathogènes, dont la nuisibilité est très importante. Les maladies fongiques constituent un des principaux facteurs responsables de l'instabilité des rendements. Selon leur impact économique dans la région méditerranéenne, on relève le *Colletotrichum trifolii*, qui est particulièrement dommageable sur la luzerne (Dickman, 2000 ; Dumas & al, 2000). On trouve aussi le *Botrytis fabae* sur fève (Elad & al, 2007 ; Salhi, 2004), l'*Ascochyta rabiei* sur pois chiche, où 100% des pertes de récoltes peuvent être enregistrées (Bouznad & al, 1996), suivi par le flétrissement fusarien causé par *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. La fusariose vasculaire due à *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* sur lentille, et la pourriture noire des racines due à *Rhizoctonia solani* causent parfois des pertes considérables (Setti & Bouznad ; 1998 Belabid & al, 2000). Les maladies causées par les espèces du genre *Phoma* et *Ascochyta* sur les diverses espèces de *Fabaceae* alimentaires et fourragères sont très importantes. La sévérité de leur attaque est variable mais très présente en Algérie ; elles engendrent d'importants dégâts (Belakroum & Sarri, 1998 ; Boumediène & Bouznad, 2006)

## 1.3. Présentation des principaux agents d'antracnose et de pourriture à *Phoma* spp. et à *Ascochyta* spp.

---

### 1.3.1. Taxonomie des genres *Phoma* et *Ascochyta*

Ces agents pathogènes appartiennent à l'Ordre des *Sphaeropsidales* et aux Genres *Phoma* et *Ascochyta*. Les téléomorphe de certaines espèces ont été trouvés. Ce sont des *Ascomycètes* appartenant au genre *Didymella* et *Mycosphaerella*.

Habituellement la classification de ces deux genres est :

Régne *Fungi*

Phylum *Ascomycota*

Classe *Dothideomycetes*

Sous classe *Pleosporomycetidae*

Ordre *Pleosporales*

Genre *Didymella* / *Mycosphaerella*

La taxonomie de *Phoma* et d'*Ascochyta* étant complexe, la nomenclature qui a évolué au cours du temps a entraîné beaucoup de confusion. Ainsi, plusieurs auteurs ont tenté de classer les nombreuses espèces pathogènes appartenant aux deux genres afin de distinguer les espèces ou variétés du genre *Phoma* des *Fabaceae* selon les plantes hôtes.

Le plus grand effort consacré pour la systématique du genre *Phoma* qui renferme les espèces les plus ubiquistes dans la nature, a été fourni par Boerema & al (2004). Ils se sont basés sur les caractères morphologiques et culturaux pour établir une clé de détermination des espèces inféodées à ce genre. Par conséquent ils ont divisé l'ancien genre *Phoma* en 9 sections, chacune représentée par une espèce type (Tableau 1).

Tableau 1 : Présentation des neuf sections du genre *Phoma*, avec leurs espèces type associées à leur genre téléomorphe (Boerema, 1997).

Section	Espèce type	Genre teleomorph
<i>Heterospora</i>	<i>P. heteromorphospora</i>	-
<i>Macrospora</i>	<i>P. zea-maydis</i>	<i>Didymella</i>
<i>Paraphoma</i>	<i>P. radicina</i>	-
<i>Peyronellaea</i>	<i>P. glomerata</i>	-
<i>Phoma</i>	<i>P. herbarum</i>	<i>Didymella</i>
<i>Phyllostictoides</i>	<i>P. exigua var. exigua</i>	<i>Didymella</i>
<i>Pilosa</i>	<i>P. betae</i>	<i>Pleospora</i>
<i>Plenodomus</i>	<i>P. lingam</i>	<i>Leptosphaeria</i>
<i>Sclerophomella</i>	<i>P. complanata</i>	<i>Didymella</i>

Bien que la clé de détermination soit utile pour l'identification des espèces, selon Aveskamp & al (2008), il est encore incertain que cette division peut être considérée dans une perspective évolutive. Il se trouve que de nombreux caractères liés à une section donnée, semblent se produire parfois chez des espèces placées dans d'autres groupes taxonomiques. En outre, la relation entre les genres *Phoma* et *Ascochyta* qui produisent des conidies cloisonnées, reste mal élucidée.

### 1.3.2. Description morphologique et culturelle des genres *Phoma* et *Ascochyta* sur *Fabaceae*

Chez les genres *Phoma* et *Ascochyta*, les colonies obtenues *in vitro* se caractérisent par la présence de pycnides globuleuses. Elles sont plus ou moins colorées, foncées, brunes ou noires pour le genre *Phoma* et plus claires pour le genre *Ascochyta* (Sutton, 1980). Ces pycnides sont pourvues d'un ou plusieurs ostioles (von Arx, 1987) d'où s'échappe un cirrhe de couleur variable contenant des conidies, mode de reproduction asexuée. Les conidies sont majoritairement monocellulaires chez beaucoup d'espèces du genre *Phoma* avec une taille de 3-10 µm x 1-4 µm (Boerema & al, 1993 ; Boerema & al., 2004). Elles sont représentées par *P. medicaginis. var. medicaginis* (Fig. 1,a), et *P. Pinodella* (Fig. 1,b).

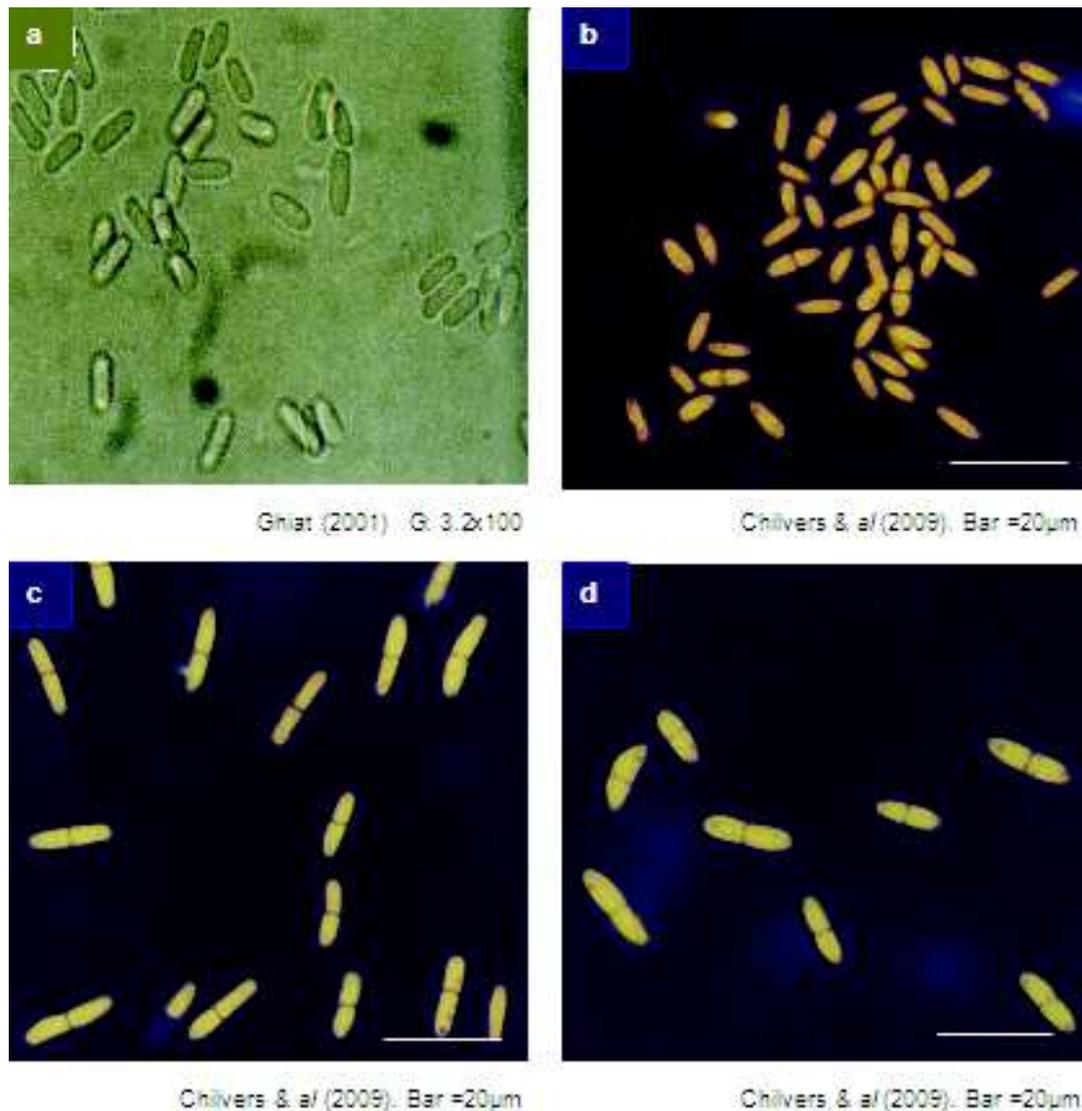
Par contre, elles sont majoritairement bicellulaires voir tri cellulaires et mesurent 6-20µm x 3- 8 µm chez le genre *Ascochyta* (Boerema & al, 2004). Ce genre, est illustré par l'espèce *Ascochyta pisi* (Fig.1, c) et *Mycosphaerella pinodes* (Fig.1, d). Il se trouve que certains isolats possèdent des caractères morphologiques intermédiaires, ce qui rend difficile leur classement dans l'un ou l'autre des deux genres (Berthier, 1997). La taille des conidies de quelques espèces de *Phoma* et *Ascochyta* les plus répandues sur les *Fabaceae* sont mentionnées dans le Tableau 2.

La présence de chlamydospores abondantes, intercalaires ou terminales, solitaires ou en chaînes peut être observée sur les colonies de *Phoma*, permettant ainsi la conservation du champignon (Boerema & al, 2004). On peut également observer des chlamydospores chez certaines espèces d'*Ascochyta* (Bouznad & al., 1995), en plus des pseudothèces (Boerema & al., 2004).

Tableau 2: Dimensions des conidies des principales espèces de *Phoma* et *Ascochyta* des *Fabaceae* (Berthier, 1997)

Espèces	Longueur des conidies	Largeur des conidies	Conidies unicellulaires	Conidies Bicellulaires
<i>P.m.var medicaginis</i>	5-7 (-12,5)	1,5-4	++	
<i>P.m.var macrospora</i>	6,5-11	2-3	+	+
<i>P.pinodella</i>	4-10	2-4	+	+
<i>A..pisi</i>	10-16	3-4,5	-	+++
<i>A.pinodes</i>	8-16(-18)	3-4,5(-5)	+	+++
<i>A.rabiei</i>	10-16	3,5	+++	+
<i>A.viciae</i>	17	4,5	-	+++
<i>A.lentis</i>	10-23	4-8	-	
<i>A.fabae</i>	16-24	3,5-6	-	+++
<i>A.trifolii</i>	15-22	4,5-6	+++	+

Cependant, la détermination de ces deux genres lorsqu'elle est basée sur la morphologie des pycnidiospores s'avère difficile, puisque le pourcentage des spores septées et leur taille dépend des conditions de cultures et de leur âge (Onfroy & al, 1999). De ce fait, la ressemblance et le chevauchement des caractères morphologiques empêchent souvent de parvenir à une détermination fiable. En effet, chez certains isolats appartenant à ses deux genres, la présence de caractères morphologiques intermédiaires rend difficile la distinction entre les deux genres (Peever & al, 2007). C'est l'une des raisons pour laquelle de nombreuses études ont été menées pour apporter des critères supplémentaires à la distinction de ces espèces (Bouznad & al, 1998 ; Boumediene & Bouznad, 2006 ; De Gruyter & al, 2009).



**Figure1** : Aspect morphologique des conidies de quelques espèces de *Phoma* et d'*Ascochyta* sur *Fabaceae*.

- (a): *Phoma medicaginis* var *medicaginis*
- (b) : *Phoma pinodella*,
- (c) : *Ascochyta pisi*,
- (d) : *Mycospherella pinodes*

### 1.3.3. Espèces de *Phoma* et *Ascochyta* décrites sur *Fabaceae*

Le problème ne se pose pas pour les espèces du genre *Ascochyta* où pour chaque espèce de plante hôte la distinction du pathogène qui lui est inféodée se fait sans difficulté. Ainsi, les pathogènes les plus connus sont *A. lentis* sur lentille, *A. rabiei* sur pois chiche, *A. fabae* sur la fève, *A. viciae* sur la vesce et *A. pisi* sur le pois. Ils ont un grand impact sur le rendement dans de nombreuses zones de culture des *Fabaceae* (Tivoli & Banniza, 2007).

Pour le genre *Phoma*, la détermination des espèces pathogènes sur *Fabaceae* n'est pas aisée vu la confusion qui existe dans leur identification et leur caractérisation. Quatre espèces pathogènes de *Phoma* provoquant des nécroses sur feuilles, tiges, collet et pourriture des racines sont décrites sur les principales *Fabaceae* fourragères et même alimentaires à l'heure actuelle.

1. *Phoma medicaginis*: En 1993, après la révision de la nomenclature de certaines espèces de *Phoma*, Boerema & al. (1993) ont pu scinder *Phoma medicaginis* en deux espèces distinctes.

1.1 *Phoma medicaginis* Malbr. & Roum. var *medicaginis* (Boerema, 1997) : Cette espèce attaque principalement la luzerne, mais aussi d'autres légumineuses à savoir la vesce, les trèfles et le pois (Angevain & al, 1989). Cette espèce caractérisée par des conidies monocellulaires de petite taille 5,7-7,2 x 2,1-2,3 µm, est très répandue dans les régions à climat relativement chaud (Lawyar, 1990)

1.2 *Phoma medicaginis* var. *macrospora* Boerema, R. Pieters & Hamers (1993) : Connue sous l'appellation *Ascochyta imperfecta*. Peck (1912), puis *Phoma medicaginis* var *medicaginis* f. *macrospora* Rössner (1968). Cette espèce est plus spécifique que *P.m.* var. *medicaginis* puisqu'elle est très agressive sur luzerne pérenne et la grande taille des conidies généralement uni et tricellulaires est de 6,3-11 x 2,1-2,9µm (Boerema & al, 2004).

2. *Phoma pinodella* (L.K.Jones) Morgan-Jones et Burch (syn. *Ascochyta pinodella* L.K. Jones(1927) ; *Phoma trifolii* E.M. Johnson et Valleau (1933) et *Phoma medicaginis* var *pinodella* (L.K. Jones)Boerema (1965) : Cette espèce a été décrite et isolée principalement sur pois. Elle peut aussi être pathogène sur le trèfle violet et la féverole (index fungorum, 2007). Elle est surtout impliquée dans le complexe parasitaire des *Ascochyta* provoquant la maladie de l'antracnose du pois, potentiellement dévastatrice (Kraft & Pflieger, 2001 ; Kaiser & al., 2008) en association avec *Mycosphaerella pinodes* ( anamorphe : *Ascochyta pinodes*), dont la taille des conidies bi et tricellulaires est de 8-16 x 3-4.5 µm et avec *Ascochyta pisi* (Lawyer, 1990 ; Allard & al., 1993; Faris- Mokaiesh 1995). La forme parfaite de *Ascochyta pisi* a été récemment identifiée par Chilvers & al (2009) et a été classée dans le genre *Didymella* d'où le nom de *Didymella pisi* Chilvers, J.D. Rogers & Peever, (2009).

*Phoma pinodella* peut être liée également au complexe de la pourriture racinaire du pois avec *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani*. Ces champignons ont été isolés à partir des racines de pois (Persson & al, 1997 ; Gaurilcikiene & al, 2008). Le téléomorphe de *P. pinodella* a été rapporté par Bowen & al (1997) mais na pas été confirmé.

3. *Phoma Koolunga* : Ce pathogène s'ajoute au complexe de l'antracnose sur pois. *Phoma Koolunga* Davidson, Hartley, Priest, Krysinska-Kaczmarek, Herdina, Mackay & Scott (2009) a été découvert au sud de l'Australie et décrit par Davidson & al.(2009). Il induit des symptômes typiques de l'antracnose et présente un pourcentage très important de conidies aseptées de grande taille 12,5-17 x 5-7µm. Il peut s'attaquer en plus du pois à certains cultivars de *Medicago* annuelles à savoir, *Medicago littoralis*, *Medicago scutella* et la lentille ( *Lens culinaris*).

### 1.4. Diversité phénotypique et génétique des *Phoma* spp. et *Ascochyta* spp. des *Fabaceae*

---

La diversité phénotypique et génétique des populations pathogènes a été étudiée par l'utilisation de marqueurs développés au cours des années (Newton, 1987).

---

### 1.4.1. Diversité morphologique et culturelle

Les variations culturelles chez les espèces des genres *Phoma* et *Ascochyta* ont été nettement observées. En effet, la pigmentation des colonies présente une grande variabilité au sein d'une seule espèce et dépend de la variation des facteurs environnants (Leath, 1992 ; Aveskamp & al, 2008). La zonation est présente également chez certaines espèces, une alternance de zone à production de mycélium et de pycnides fréquemment observée chez le genre *Phoma* et certaines espèces d'*Ascochyta* (Onfroy & al, 1999). Cette zonation peut être très nette chez l'espèce *P. pinodella*, moins prononcée chez l'espèce *P. m. var. medicaginis* et plus claire chez *M. pinodes*.

Par ailleurs, Tivoli & al (1997) rapportent que les isolats des agents d'antracnose sont généralement caractérisés par une grande variabilité des caractères cultureux qui sont souvent instables. Cette variabilité a été également observée chez des isolats d'*A. lentis* (Kaiser & al, 1994). La croissance mycélienne a montré une similitude entre les *Phoma* et les *Ascochyta*. Noordeloos & al (1993) ont montré que la croissance de *P. m. var. medicaginis* est de la même intensité que *M. pinodes*, mais moins rapide que celle de *P. pinodella*.

Dans certains cas, la variabilité morphologique des conidies chez certaines espèces appartenant au genre *Phoma*, n'est pas suffisamment bien différenciée à l'aide de ces critères. En effet, Bouznad & al (1995), ont confirmé la difficulté de l'identification et la caractérisation des espèces de ce genre, inféodées aux *Fabaceae* par les caractères morphologiques.

Irinyi & al (2009), ont également révélé la grande variabilité des caractères morphologiques, à savoir la forme et la taille des conidies sur différents substrats chez les espèces du genre *Phoma*. Il a été conclu que les critères morphologiques et cultureux qui fournissent des informations importantes, ne constituent pas un outil suffisant pour la distinction des espèces, compte tenu de leur variabilité.

### 1.4.2. Compatibilité végétative

Les champignons imparfaits à reproduction asexuée peuvent échanger du matériel génétique par voie végétative ou, parasexualité (Bridge & al, 1998). Pour que ce phénomène se produise, plusieurs étapes successives sont nécessaires. La première étant la fusion ou l'anastomose des filaments mycéliens appartenant à deux souches de constitution génétique différente, permettant la formation d'hétérocaryon au cours des phases sexuées et végétatives, suivie d'une recombinaison mitotique. En effet, le terme hétérocaryose, a été introduit, pour désigner la phase durant laquelle deux ou plusieurs noyaux génétiquement différents sont présents dans le même protoplaste. Les souches capables de former ces hétérocaryons sexués ou végétatifs sont considérées respectivement sexuellement ou végétativement compatibles (Leslie, 1993).

Pour que deux souches d'un même champignon soient végétativement compatibles, il faut que les allèles situées à tous les loci *het* soient identiques (Correll & al, 1987 ; Kistler, 1997). Ces souches qui formeront des hétérocaryons appartiennent au même groupe de compatibilité végétative (Leslie & Summerell, 2006). Différents critères ont été utilisés pour la mise en évidence de la compatibilité végétative entre les souches de champignons. Ces critères concernent surtout l'autotrophie.

Selon Leslie, (1993), tout marqueur perdu sous l'influence d'une mutation présentant une fréquence assez élevée et qui peut être rétablie par la complémentation, est un marqueur pouvant être utilisé pour mettre en évidence une hétérocaryose par compatibilité végétative. En pratique, des marqueurs auxotrophes ou pigmentaires sont souvent

utilisés, car les cellules hétérocaryotiques comportant des noyaux portant des mutations complémentaires sont faciles à détecter. A cet effet, de nombreux chercheurs ont tenté d'utiliser le fait que des individus portant des mutations complémentaires pouvaient générer en cas d'anastomose un mycélium hétérocaryotique, en particulier vis-à-vis des nitrates. Puhalla (1985) en s'inspirant de la technique décrite chez *Aspergillus nidulans* par Cove (1976), a mis au point une méthode d'étude de la compatibilité végétative chez le *Fusarium oxysporum*. Cette méthode améliorée par Correll & al (1987), est basée sur l'utilisation de mutants spontanés incapables d'assimiler l'azote nitrique (mutants nit). Appelés aussi mutants résistants au chlorate, ces derniers présentent un grand intérêt, en raison de la fréquence élevée de leur apparition et de la facilité de leur mise en œuvre dans le cadre d'étude de la compatibilité végétative.

Le principe de la compatibilité végétative est basé sur la formation d'hétérocaryon prototrophe stable par confrontation de mutations auxotrophes dans des conditions où aucun de ses mutants ne peut se développer seul. La formation d'hétérocaryon se traduit par la présence d'un mycélium aérien dense au niveau de la zone de rencontre des deux thalles mutants ; son absence explique l'incompatibilité des souches.

La compatibilité végétative ou l'hétérocaryose est fondée sur la mise en évidence de la formation d'hétérocaryons. Le phénomène a été étudié chez de nombreux *Ascomycètes* notamment le *Fusarium oxysporum*, l'*Aspergillus nidulans*, le *Neurospora crassa* et le *Podospora anserina*. Furgal-Wegrzycka & Wegrzycki (2009), avaient distingué 29 GCVs, ainsi une variabilité importante a été notée en étudiant la diversité génétique de trois populations régionales polonaises d'*A. pinodes* et de *P. pinodella* par l'évaluation de la fréquence des GCVs sur 10 années d'études (1990-2004), La distribution de ces groupes n'était pas semblable dans une même région et entre les régions à travers les années. Selon les mêmes auteurs, établir des liens entre la structure des populations de *A. pinodes* et *P. pinodella* dans le temps est essentiel pour la conception de pratiques de gestion visant à limiter l'apparition et la propagation de génotypes nouveaux.

L'étude de la compatibilité végétative s'est avérée très fructueuse pour analyser la structure des populations des champignons ; elle est considérée comme un outil puissant dans ce type d'analyse (Burdon, 1993).

### 1.4.3. Diversité génétique

Une spécificité d'hôte confuse et mal établie, ainsi qu'une taxonomie complexe des deux genres *Phoma* et *Ascochyta*, ont conduit à l'utilisation de nouvelles techniques biochimiques et moléculaires capables d'apporter plus de précision dans la connaissance et la classification de ces agents pathogènes. En effet, les analyses électrophorétiques des protéines totales (Bouznad & al, 1997) et des isoenzymes, ont été appliquées pour l'étude des pathogènes des Fabacées (Boumediene, 2003; O'Neill & al, 1997).

Depuis, l'application des méthodes moléculaires pour l'étude des champignons pathogènes a permis de mieux préciser leur taxonomie. Ces outils puissants qui sont devenus courants, en particulier la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), la AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) et les Microsatellites, single ou simple sequence repeat (SSR), le séquençage (Single Nucleotide Polymorphisms (SNP), Internal Transcribed Spacer (ITS)) ont grandement montré leur intérêt, pour résoudre les problèmes d'identification, et évaluer les niveaux de diversité génétique des populations pour établir des relations taxonomiques entre les espèces (Guarro & al, 1999 ; Setti & al, 2011). Ces techniques ont permis aussi d'identifier les principales espèces d'*Ascochyta* et de *Phoma* (Berthier, 1997 ; Faris-

Mokaiesh, 1995), et de montrer que les espèces de *Phoma*, forment un groupe distinct des espèces d'*Ascochyta* (Boumediene, 2003 ; Irrigni & al, 2007).

L'analyse du polymorphisme de certains isolats du genre *Phoma* et *Ascochyta* par RAPD a mis en évidence une grande variabilité interspécifique (Bouznad & al, 1995). Chaque espèce d'*Ascochyta* présente un profil particulier, notamment *A. viciae*, *A. fabae*, *A. pisi* et *A. lentis* qui se distinguent nettement de *M. pinodes* et de *P. pinodella* ainsi que de *A. rabiei*. En particulier, il a été montré que *A. rabiei*, qui présente un pourcentage important de conidies monocellulaires, est très éloigné des autres espèces. En effet, sa dénomination a été changée par Boerema & al. (2004). De même, Peever & al (2007) le considère plutôt mieux placé dans le genre *Phoma* et propose le nom de *Phoma rabiei*(Pass) Khune ex Gruyter, (2002). Les travaux de Hernandez-Bella & al. (2006) basés sur l'étude phylogénétique des séquences ITS, ont corroboré ce qui précède.

Des études récentes viennent appuyer les conclusions déjà citées. Tadjia & al. (2009) et Peever & al. (2007) ont étudié les régions ITS de l'ADN mitochondrial des espèces impliquées dans la maladie de l'antracnose du pois et ont retenu que *M. pinodes* et *P. pinodella* sont étroitement liées. Cependant elles sont clairement distinctes d'*A. pisi*. Ce résultat correspond bien aux études morphologiques et moléculaires précédentes (Bretag & Ramsey, 2001 ; Fatehi & al, 2003 ; Onfroy & al, 2007). Dans le même sens, Peever & al. (2007) ont pu différencier ces deux espèces étroitement liées, en se basant sur l'analyse phylogénétique des séquences G3PD. Ils ont également montré que *M. pinodes*, forme parfaite de *A. pinodes* se regroupe avec des espèces de *Didymella* et non avec des espèces caractéristiques de *Mycosphaerella*. Ils proposent ainsi que le nom *Didymella pinodes* soit utilisé pour désigner ce dernier champignon.

Après avoir étudié la  $\beta$ - tubuline et le facteur d'élongation de la traduction de codage (tef1) de certains isolats des espèces de *Phoma* (*Phoma pinodella*, *P. exigua*, *Phyllosticta sojicola*) Irinyi & al. (2009a), ont suggéré de reclasser *Phoma sojicola* comme synonyme de *Phoma pinodella* et *Phyllosticta sojicola* comme synonyme de *Phoma exigua*. var. *exigua*. Ces données récentes conduisent à considérer que les techniques moléculaires récemment développées, constituent un moyen plus performant pour la détermination et la reconnaissance de beaucoup d'espèces en particulier les espèces de *Phoma*, dont la taxonomie est très controversée jusqu'à lors (Irinyi & al., 2009b).

## 1.5. La spécificité parasitaire :

Chez les genres *Phoma* et *Ascochyta* inféodés aux *Fabaceae*, l'étude de la spécificité parasitaire a fait l'objet de plusieurs travaux afin d'identifier la gamme d'hôtes pour lesquels des champignons phytopathogènes sont les plus redoutables et dont la spécificité parasitaire est encore mal définie (Berthier, 1996; Corbiere & Bouznad, 1998, Boumediene & al, 2009).

Les inoculations artificielles de divers *Fabaceae* par les *Ascochyta* spp. à savoir, *A. pisi*, *A. rabiei*, *A. lentis*, *A. fabae*, et *A. viciae* respectivement sur le pois, le pois chiche, la lentille, la fève et la vesce, ont permis de constater qu'aucun symptôme n'a été visible lorsqu'ils sont inoculés sur des espèces non hôtes. Il reviendrait à dire que ces agents pathogènes ne peuvent induire de nécroses sur les espèces de plantes autres que celles à partir desquelles ils ont été isolés (Gossen & al, 1986 ; Kaiser & al, 1997 ; Khan & al, 1999 ; Hernandez-bello & al, 2006). Par conséquent une grande spécificité parasitaire est notée chez les espèces d'*Ascochyta*.

En effet, Peever & *al.* (2007) rapportent que ces pathogènes sont parfaitement spécifiques à leur hôte d'isolement. Néanmoins, *A. pisi* peut attaquer la vesce (Abouzaied & El-Tarabil, 2003). Cependant, Kaiser (1990) a observé des symptômes légers après inoculation artificielle de la lentille et du pois par *A. rabiei*.

En revanche, chez le genre *Phoma*, la spécificité a été à la base de la classification des espèces de ce genre. Il se trouve qu'elle est encore mal établie, ce qui pose un problème pour les mycologistes. Seules trois espèces sont principalement étudiées, *Phoma medicaginis* var *medicaginis* isolée de la luzerne pérenne (Boerema, 1976), qui attaque les *Medicago* annuelles (Castell-Miller & *al.*, 2008) ainsi que d'autres *Fabaceae* telles que le trèfle, et le soja. Cette espèce pourrait également être isolée sur pomme de terre (Sutton, 1980). La seconde espèce *Phoma medicaginis* var *macrospora* est spécifique à la luzerne pérenne (Boerema & *al.* (1993). Le troisième pathogène, *Phoma pinodella* a comme hôtes principaux le pois et le trèfle violet d'où son ancienne appellation *Phoma trifolii* (Noordeloos & *al.*, 1993 ; Boerema & *al.*, 2004). Cependant, elle peut infecter d'autres *Fabaceae*, puisqu'elle a été isolée de pois chiche (Tivoli & Banniza, 2007).

# Chapitre II Matériel et méthodes

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Matériel fongique

#### 2.1.1. Isolats étudiés

Notre étude a été menée sur une collection de 26 isolats de *Phoma* et d'*Ascochyta* provenant de différentes *Fabaceae*. Quatorze isolats proviennent du laboratoire de mycologie (ENSA d'El-Harrach) et quatre isolats ont été obtenus à partir de l'INRA de Rennes. Les autres isolats ont été isolés à partir d'échantillons frais de pois, (*Pisum sativum*) et de culture de trèfle d'alexandrie (*Trifolium alexandrinum*) présentant des nécroses sur feuilles, collets et tiges récoltés durant les années 2002 et 2003 à la station de l'ITGC de Oued- S'mar. Ces isolats sont comparés à 3 souches de référence *P. medicaginis*, *P. pinodella* et *M. pinodes*.

Les isolats étudiés ainsi que leurs origines sont présentés au Tableau 3.

Tableau 3 : Origine des isolats de *Phoma* et d'*Ascochyta* étudiés.

Isolat	Plante hôte	Lieu de prélèvement	Date
P.Ta. 06.03 P.Ta. 03.03 P.Ta. 99.02 P.Ta. 98.04 A.Ta.98.03 P.Tp. 95.03 P.Tp. 95.02 P.Luz.92.01 PaPc. 92.01 PaPc. 95.21 PaPc. 91.01 PaPc. 91.03 Pa. 94.03 Pa. 94. 71.1 Pa. 95.21 Pa. 95.01 Pa. 09.02 Pa. C8 Pa 21.03 Pa 15.03 Pa 10.03 Mp. 94.774 Mp1 Mp. 08.03 Mp. 07.03 Mp. 94.14.7 p isi vicia lentis rabiei fabae	<i>Trifolium alexandrinum</i> <i>Trifolium alexandrinum</i> <i>Trifolium alexandrinum</i> <i>Trifolium alexandrinum</i> <i>Trifolium alexandrinum</i> <i>Trifolium pratense</i> <i>Trifolium pratense</i> <i>Medicago sp</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Vicia sativa</i> <i>Lens culinaris</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Vicia faba</i>	Oued-Smar Oued-Smar Oued-Smar Oued-Smar St Cyr (18) St Cyr (18) Merdja Oued-Smar Maroc Tessala Miliiana Rennes France Maroc Mostaganem Canada Biskra Harrach Kouba Rennes Belgique Kouba El harrach Rennes Kouba Collo Tiaret S.B.Abbes S.B.Abbes	2003 2003 1999 1998

#### 2.1.2. Isolement et purification des isolats

Les isolements sont effectués, à partir de fragments de collets, tiges et/ou feuilles. Ces fragments d'environ 1 cm de diamètre sont désinfectés à l'hypochlorite de sodium à 2 %

pendant 5 minutes. Ils sont ensuite rincés à l'eau distillée stérilisée, séchés puis déposés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé Mathur (Annexe 1), ce milieu permet une forte sporulation du champignon. Les boîtes sont incubées sous une lumière continue à une température ambiante de 18-20° C.

Les isolats ayant des aspects cultureux et morphologiques correspondant aux genres *Phoma* et *Ascochyta* sont sélectionnés puis purifiés par culture monospores. A partir de suspensions de spores de  $10^2$  à  $10^3$  spores/ml, 0,5ml sont prélevés puis étalés sur des boîtes de pétri en Pyrex stérile contenant une lame recouverte par une mince couche d'eau gélosé à 4%. Après 12 à 16 heures d'incubation à 22°C, temps mis par les spores pour germer. Le prélèvement d'une seule spore à l'aide d'une pipette pasteur est effectué sous la loupe binoculaire. Les spores sont repiquées sur le milieu de culture « Mathur ». Les colonies pures obtenues sont repiquées dans des tubes à essai et maintenues à 4-5° C pour la conservation des isolats.

## 2.2. Matériel végétal

---

Les espèces de *Fabaceae* utilisées pour la réalisation des inoculations artificielles afin de déterminer la gamme d'hôte de certains isolats sont présentées ci-dessous. Les semences de bersim, luzerne, pois et pois chiche nous ont été fournies par l'institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) d'Oued S'mar. Le reste des semences étaient disponibles au niveau du laboratoire de Mycologie (ENSA).

Au total, 6 espèces de *Fabaceae* ont été utilisées pour les inoculations artificielles :

- *Trifolium alexandrinum* L. (trèfle d'Alexandrie = bersim)
- *Trifolium pratense* L. (trèfle violet)
- *Medicago sativa* L. (luzerne cultivée)
- *Vicia sativa* L. (vesce cultivée).
- *Pisum sativum* L. (pois cultivée)
- *Cicer arietinum* L. (pois chiche)

## 2.3. Caractérisation morphologique des conidies

---

L'étude de la morphologie des conidies a porté sur la taille (mesuration de la longueur et du diamètre) et le nombre de septation des conidies prélevées à partir de cultures âgées de 10 jours sur milieu Mathur, et incubées à une température comprise entre 20 et 22° C. La taille des conidies est mesurée à l'aide d'un micromètre oculaire, placé au niveau de l'oculaire d'un microscope optique étalonné.

L'évaluation du pourcentage de conidies monocellulaires et bicellulaires ainsi que leurs tailles (longueur, diamètre) a été effectuée sur 100 conidies pour chaque isolat.

L'analyse de la variance de la taille des conidies a été réalisée avec le logiciel STATITCF (version 5, 1998). Cette analyse permet de regrouper les isolats sur la base du test de Newman et Keuls à 5 %.

## 2.4. Etude de la compatibilité végétative des isolats

---

### 2.4.1. Sélection des mutants « Nit »

---

Elle consiste à sélectionner des mutants spontanés pour chaque isolat étudié de la collection. A cet effet, 20 fragments mycéliens sont prélevés à partir de cultures jeunes, et déposés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu minimum, MM+C, à base de chlorate à différentes concentrations (Annexe 2) ; ces explants sont déposés à environ 2 cm les uns des autres. Les boîtes sont incubées à 22- 25 °C pendant 7 à 10 jours, durée nécessaire pour le développement des mutants résistants au chlorate. Les mutants « Nit » ainsi, sélectionnés sur milieu MM+C feront l'objet d'une caractérisation.

#### 2.4.2. Caractérisation des mutants « Nit »

Cette étape d'étude consiste à déterminer le type de mutation auquel appartiennent les mutants sélectionnés sur milieu MM+C (Correll & al, 1987). Trois types de mutations sont possibles, en caractérisant trois mutants à savoir : Nit1, Nit3 et NitM.

Tous les mutants sélectionnés sur le milieu MM+C sont mis en culture sur le milieu minimum MM (Annexe 2), qui contient le nitrate comme seule source d'azote ; cela permet de vérifier si ces mutants sont des non-utilisateurs de nitrate. Les mutants présentant un thalle aérien épais de type sauvage sont éliminés et ceux présentant un mycélium ras seront maintenues et caractérisées. Leur reconnaissance est possible grâce à la différence de leur développement sur des milieux contenant différentes sources d'azote à savoir : le nitrate, le nitrite et l'hypoxanthine (Annexe 2) Tableau 4.

**Tableau 4 : Identification des mutants non utilisateurs du nitrate par leur croissance sur trois sources d'azote**

Sites de la mutation	Croissance sur différentes sources d'azote			
	Type de mutants	Nitrate Na No <sub>3</sub>	Nitrite Na No <sub>2</sub>	Hypoxanthine HPX
Gène de structure de la nitrate réductase.	Nit 1	r	A	A
Gène de régulation de la nitrate et de la nitrite réductase.	Nit 3	r	R	A
Gènes commandant la synthèse du cofacteur à molybdène.	Nit M	r	A	R

**A** : mycélium aérien dense ; **r** : mycélium ras, sans filament aérien. (Correll & al, 1987)

#### 2.4.3. Confrontation des mutants « Nit » et détermination des groupes de compatibilité végétative

Le test de l'auto-compatibilité des isolats pour lesquels ont été sélectionnés au moins un Nit M et un Nit 1 ou Nit 3, est une étape importante pour la suite de cette étude ; des fragments mycéliens sont prélevés de chaque mutant. Ces derniers sont déposés à 2 cm l'un à côté de l'autre dans une boîte de Pétri contenant du milieu minimum MM. Après 7 jours d'incubation à 25 °C, la présence ou l'absence d'un mycélium aérien dense aux zones de rencontre des deux thalles mutants permet de lire l'auto-compatibilité ou l'auto-incompatibilité de l'isolat. Seuls les isolats auto-compatibles sont retenus pour la suite de l'étude.

La compatibilité végétative des différents isolats étudiés est testée par confrontation des mutants Nit M et Nit1 ou Nit3, selon toutes les combinaisons possibles et selon le principe déjà cité ci-dessus.

## 2.5. Caractérisation des isolats par RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

---

### 2.5.1. Production de mycélium pour l'extraction de l'ADN génomique

Le mycélium des isolats est produit en milieu liquide à base de pomme de terre et de glucose (Annexe 1). Cinq explants de 8 mm de diamètre sont prélevés à partir de cultures âgées de 7 jours, puis sont introduits dans des erlenmeyer de 500 ml contenant 150 ml de milieu de culture, puis incubés à 22°C à l'obscurité pendant 10 jours. Le mycélium est ensuite récupéré par filtration dans des conditions stériles (filtre). Le mycélium est rincé plusieurs fois avec de l'eau stérilisée, séché avec du papier buvard puis stocké au congélateur.

### 2.5.2. Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN est réalisée selon le protocole de Lee & Taylor (1990). Le genre *Phoma* produit un mycélium contenant beaucoup de polysaccharides (Berthier, 1997) ; ces derniers sont très difficiles à séparer de l'ADN. Néanmoins, le tampon de lyse utilisé est composé de Tris HCL, de SDS, d'EDTA et de mercaptoéthanol (Annexe 3), cité dans plusieurs travaux de recherche, permet d'extraire des quantités suffisantes et pures d'ADN (Berthier, 1997 ; Bouznad & al, 1995 ; Blossier, 1997).

Le protocole d'extraction (Annexe 4) comprend plusieurs étapes dont les plus importantes sont la lyse cellulaire, l'élimination des débris cellulaires et la précipitation des protéines et des polysaccharides. L'ADN obtenu est dissout dans une phase aqueuse et est précipité par l'isopropanol froid sous forme d'une pelote. Cette dernière est lavée avec de l'éthanol 70%, puis dissoute dans 0,2 ml de tampon TE (Annexe 3) puis conservée à 4°C.

### 2.5.3. Electrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose (Estimation quantitative et qualitative de l'ADN)

Les extraits d'ADN obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (Annexe 4). A cet effet, un mélange de 5 µl d'ADN et 5 µl de tampon de charge (Loading buffer) pour chaque isolat, est déposé dans les puits du gel. La migration est réalisée sous une tension de 100 Volts pendant 30 minutes et le gel obtenu est déposé dans une solution de Bromure d'Ethidium BET à une concentration de 1 µg/ml (Annexe 3) puis visualisé sous UV sur un trans illuminateur.

La concentration et la qualité de l'ADN sont estimées par les lectures de la densité optique au spectrophotomètre, aux longueurs d'ondes 260 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  $\longrightarrow$  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).

### 2.5.4. Amplification des isolats par RAPD

La RAPD est basée sur le principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction). Cette dernière méthode repose sur la complémentarité des bases et la capacité de synthèse d'une séquence d'ADN comprise entre deux régions s'hybridant chacune avec une amorce spécifique (primer) à l'aide d'une enzyme polymérase.

La technique RAPD, suit les mêmes étapes que celle de la PCR, en utilisant une seule amorce de séquence arbitraire, complémentaire d'une région précise de l'ADN. Cette amorce permet l'amplification de plusieurs séquences, inconnues, sur le génome entier (Santoni & al, 2000).

Les amplifications sont réalisées avec deux amorces synthétiques, OPERON (C13 et C18) dont les séquences sont :

C13:5'- AAGCCTCGTC -3'

C18:5'- TGAGTGGGTG -3'

Ces deux amorces sont souvent utilisées dans l'amplification des espèces de *Phoma* et d'*Ascochyta*, puisqu'elles permettent l'obtention de bons profils (Berthier, 1997 ; Blossier, 1997 ; Bouznad & Corbiere, 1998 ; Onfroy & al, 1999 ; Macdonald & al., 2000 ; De gruyter & al., 2009).

#### 2.5.4.1. Milieu réactionnel et paramètres d'amplification

La concentration de l'ADN de chaque échantillon est ajustée à 10 ng/µl, après estimation de la quantité d'ADN extrait. Cette concentration est suffisante pour obtenir une bonne amplification. L'amplification est réalisée selon le protocole adapté pour les espèces de *Phoma* et d'*Ascochyta* (Bouznad & Corbiere, 1998 ; Onfroy & al, 1999).

Les concentrations des différents éléments, utilisées pour un volume de 25 µl de milieu réactionnel sont détaillées dans le Tableau 5

L'ordre	Milieu réactionnel (Mélange d'amplification)	Volume (µl)	Concentration finale
1	ADN à amplifier	5	10 ng/µl
2	Tampon de Taq spécifique x10	5	X10
3	Les désoxyribonucléotides triphosphatés (dNTP)	0,5	200 µM de chaque nucléotide
4	Amorce	0,5	2 µM
5	Taq	0,3	1,5 unité
6	Eau distillée stérile	13,7	

Tableau 5 : Composition du milieu réactionnel

L'amplification de l'ADN des échantillons est réalisée dans un thermocycleur du type PTC 100 ( MJResearch) Peltier Thermal Cycler selon un programme d'une durée d'amplification de 3h45 heures (Onfroy & al, 1999) :

1. Dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min

2. 45 cycles de : 1 min de dénaturation à 95°C, 1 min d'hybridation à 39°C et 1 min d'élongation à 72°C
3. Elongation finale à 72°C pendant 15 min

Une fois l'amplification terminée, les échantillons sont conservés à 4° C pour une utilisation ultérieure.

#### **2.5.4.2. Electrophorèse et révélation des fragments d'ADN amplifiés**

La séparation électrophorétique des échantillons amplifiés, est effectuée sur gel d'agarose à 1,2 %.

12 µl de chaque mélange [6 µl d'échantillon amplifié additionné de 6 µl de tampon de charge (Annexe3)] sont déposés dans les puits du gel, et sont mis à migrer à 80 volts dans du tampon TAE 1x (Annexe3) pendant 3h 45min.

L'ADN est coloré en plongeant le gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) à une concentration de (1µg/ml). Les profils obtenus sont visualisés sous une lumière ultraviolette à l'aide d'un trans-illuminateur ; les photos sont prises avec un appareil photo numérique.

#### **2.5.4.3. Analyse des profils obtenus**

Une matrice est établie sur la base de la présence ou de l'absence de bandes obtenues pour chacun des isolats étudiés sur gel d'agarose à 1,2%. Elle est codifiée selon un système binaire indiquant la présence (1) et l'absence (0) des différentes bandes. Cette matrice est traitée par le logiciel M. V. S. P. (Multi-Variate Statistical Package) version 3.12 de Kovach computing Services, (qui définit un indice de similitude, il permet d'analyser et comparer les isolats entre eux). La représentation graphique, sous forme de dendrogramme est réalisée selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average) en utilisant l'indice de Jaccard.

## **2.6. Etude de la spécificité parasitaire**

---

Cette étude est effectuée par la réalisation de deux inoculations artificielles, la première concerne les semences, et la seconde concerne les parties aériennes. Au total 16 isolats sont inoculés, par des représentants des différents groupes obtenus par l'étude morphologique des conidies.

#### **2.6.1. Préparation de l'inoculum**

Des explants d'isolats sont prélevés à partir de colonies âgées de 10 jours environ et mis dans des erlenmeyer contenant de l'eau distillée stérilisée. Les suspensions sont obtenues par agitation pour que les pycnides libèrent leurs conidies, et la concentration est estimée à l'aide d'une cellule de Malassez. Les concentrations finales sont ajustées à  $1.10^6$  spores/ml pour chaque isolat, par dilution avec de l'eau distillée.

#### **2.6.2. Technique d'inoculation**

Les plantes choisies pour cette étape d'étude, sont les principales espèces hôtes à partir desquelles un certain nombre d'isolats étudiés ont été isolés. L'inoculation est réalisée en deux étapes. La première consiste à tremper les semences pré-germées dans les

suspensions de spores de chaque isolat pendant 20 minutes. Les semences témoins sont immergées dans de l'eau stérilisée. Les graines sont ensuite semées délicatement à l'aide d'une pince dans des terrines (30 x 30 cm) contenant un mélange de terre, terreau et sable (1/3,1/3,1/3). La deuxième étape consiste à inoculer les jeunes plants issus des graines déjà inoculées, âgés de 28 jours (stade 3 feuilles), par pulvérisation de la suspension de spores ( $10^6$ /ml) sur le feuillage (Angevain, 1983). Les terrines sont ensuite recouvertes par un couvercle en plastique transparent simulant une mini serre, afin de conserver une hygrométrie maximum pour la sporulation et de permettre le développement du champignon pendant 3 jours

### **2.6.3. Dispositif expérimental**

Un dispositif expérimental en Bloc aléatoire complet est retenu pour le test d'inoculation.

Pour chaque isolat trois répétitions sont réalisées avec quatre terrines témoins, à raison de deux terrines par isolat. Au niveau de chaque terrine, les plants sont placés à raison de trois lignes contenant chacune 5 graines de la même espèce végétale, soit 3 espèces par terrine. Elles sont incubées dans une serre en verre à (18- 22°C).

Au 4ème jour les couvercles sont enlevés. Les plants sont régulièrement brumisés durant toute la durée de l'expérimentation jusqu'à l'apparition des symptômes.

### **2.6.4. Notations des symptômes**

La lecture des symptômes est réalisée après 15 jours pour l'inoculation par pulvérisation, et après 45 jours pour l'inoculation par trempage des semences. La présence ou l'absence d'altérations caractéristiques des différents organes de la plante (feuillages, tiges, collet et racines) sont notées.

Le nombre de plants présentant des symptômes sont transformés en pourcentage (nombre de plants atteints sur le nombre total de plants inoculés x 100). Deux types de notations ont été considérés : le pourcentage des plants présentant des nécroses sur le collet, les racines et sur les tiges, et le pourcentage des plants présentant des taches foliaires.

## Chapitre III Résultats et discussions

### 3. Résultats et discussions

#### 3.1. Description des symptômes sur bersim et pois

---

Les isollements sont réalisés à partir de plants ayant manifesté plusieurs types de symptômes, présentant des nécroses sur tiges et feuilles de bersim, et sur gousses de pois.

**Sur bersim** : Les symptômes sur les feuilles de bersim sont d'aspect variable (taille, couleur, forme). Nous avons noté la présence de taches nécrotiques diffuses de petite taille de couleur brune ainsi que des taches de couleur claire bien délimitées par une bordure foncée (Fig. 2a). Au niveau des tiges, la majorité des nécroses sont de couleur foncée diffuse avec la présence de pycnide. Ces nécroses peuvent s'étendre tout au long de la tige, parfois jusqu'au collet (Fig. 2b).

Ces symptômes sont caractéristiques des espèces appartenant aux deux genres *Phoma* et *Ascochyta*. Des attaques de *Colletotricum* sp. sont également observées, elles se sont traduites par l'apparition de taches claires à bordure rouge, et des taches noires sur tige (Fig. 2c) avec la présence d'acervules provoquant l'éclatement de l'épiderme de la plante. Ce dernier agent d'anthracnose a toujours été isolé accompagné des deux genres *Phoma* et *Ascochyta*, ce qui a rendu difficile la distinction entre les espèces.

**Sur pois** : Les gousses de pois provenant de quelques régions d'Algérie (Biskra, Mostaganem, Alger) étaient fortement attaquées. Les symptômes se présentent sous forme de taches brunes aux extrémités des gousses (Fig. 2d) et des taches claires aux bordures foncées (Fig. 2e).

Des espèces appartenant aux genres *Phoma* et *Ascochyta* sont isolées à partir des nécroses de bersim et de pois. Ces espèces sont identifiées et repiquées après une simple observation des pycnides sous la loupe binoculaire.

Une étude morphologique des conidies est réalisée sur les 26 isolats de notre collection.



**Figure2** : Symptômes d'attaque de *Phoma* spp, *Ascochyta*spp. et *Colletotricum* spp. sur bersim et pois.

- (a) : Tache nécrotique sur feuilles de bersim récolté à Oued-S'mar,
- (b) : Nécroses sur tiges de bersim,
- (c) : Symptôme de *Colletotricum* sur feuilles de bersim,
- (d) : Taches nécrotiques de couleur marron violacé sur gousse de pois,
- (e) : Nécroses diffuse de couleur claire sur gousse de pois

### 3.2. Caractérisation morphologique des isolats : septation et taille des conidies

La caractérisation morphologique des isolats est basée sur le nombre de septation et la taille des conidies (longueur et diamètre). Ces observations sont effectuées après 10 jours

de développement du champignon sur milieu Mathur ; les résultats de cette étude sont rapportés dans le tableau 6.

Les isolats sont regroupés selon le type et les proportions de septations (monocellulaires et bicellulaires), puis la taille des conidies produites.

### 3.2.1. Variation de la septation des isolats

- Isolats à conidies 100% monocellulaires

Parmi les isolats étudiés, uniquement deux possèdent que des conidies à 100% monocellulaires ; il s'agit de P.Luz.92.01 et de Pta.06.03. Les conidies sont de petites tailles avec des longueurs moyennes respectives de 5,43  $\mu\text{m}$  et 7,56  $\mu\text{m}$ . Le premier, isolé de la luzerne présente des conidies de forme cylindrique, et se sont avérées être les plus petites parmi tous les isolats. Pour le second (Pta.06.03), les conidies sont un peu plus grandes et de forme allongée.

- Isolats à conidies majoritairement monocellulaires

Ces isolats au nombre de dix-huit, présentent des conidies à majorité monocellulaires variant de 64 à 90 %, et proviennent tous de plantes hôtes diverses ; Pta.98.04, Pta.03.03, Pta.99.02 sont isolés de bersim; Ptp.95.03, Ptp.95.02 à partir de trèfle violet; PaPc.92.01, PaPc. 95.21, PaPc.91.03 et PaPc.91.01 à partir de pois chiche ainsi que le Pa.94.03, Pa.95.21, Pa.95.01, Pa C8, Pa.94.77.1, Pa. 15.03, Pa.09.02, Pa.10.03 et Pa.21.03 à partir de pois. Les conidies de ces isolats sont de tailles variables, dont les conidies septées sont plus grandes (8,19 à 12,65  $\mu\text{m}$ ) que les conidies non septées (6,24 à 10,95  $\mu\text{m}$ ). La taille des conidies de l'isolat de bersim (Pta.99.02) est la plus importante par rapport à celles du reste des isolats.

Plante hôte	Isolats	Conidies bicellulaires						Conidies monocellulaires					
		%	Longueur extrême L(µm)	Longueur moyenne L(µm)	Diamètre extrême l(µm)	Diamètre moyen l(µm)	L/l	%	Longueur extrême L(µm)	Longueur moyenne L(µm)	Diamètre extrême l(µm)	Diamètre moyen l(µm)	L/l
Bersim	A.Ta.98.03	80	12,5-17,5	15,64	3,9-5	4,58	3,41	20	10,5-12,5	11,59	2,5-3,9	3,97	2,91
	P.Ta.99.02	34	9,5-14,3	12,65	3,9-5,2	3,50	3,80	66	7,8-13	10,95	2,6-3,9	2,65	3,63
	P.Ta.98.04	20	6,5-10	8,19	2,6-3,9	3	2,96	80	5,2-7,8	6,32	2,6-3,25	2,55	2,49
	P.Ta. 06.03	0	--	--	--	--	--	100	6,5-9,1	7,56	2,6-3,25	2,42	4,86
T. violet	P.Ta.03.03	8	7,8-10,5	9,82	3,25-3,9	3,57	2,75	92	5,2-7,8	6,59	2,6-3,9	2,89	1,72
	Ptp. 95.03	20	7,8-10,4	9,23	3,25-3,9	3,32	2,74	80	5,2-8,45	6,48	2,6-3,25	2,67	2,46
Pois chiche	Ptp. 95.02	20	7,8-10,4	9,55	2,6-3,9	3,18	3,30	80	5,2-7,8	6,63	1,95-3,25	2,58	2,97
	Pa pc 91.03	46	7,8-10,4	9,72	2,6-5,2	3,73	3,01	54	6,2-10,4	7,02	2,6-3,25	2,91	2,67
	Pa pc 92.01	14	7,8-9,1	8,91	2,6-3,9	2,97	3,00	86	5,2-7,8	6,59	1,95-3,9	2,73	2,34
	Pa pc 95.21	42	11,7-13	12,28	3,9-5,2	4,51	2,92	58	5,2-7,8	6,25	2,6-3,25	2,62	2,58
Luzerne	Pa pc 91.01	36	10,4-13	12,16	2,6-5,2	4,04	3,29	64	7,8-8,45	7,88	2,6-3,25	2,68	2,04
	P.Luz.92.01	0	--	--	--	--	--	100	3,9-7,8	5,43	2,6-3,25	2,18	2,54
Pois	Pa.94.03	26	7,5-10	9,88	2,6-3,75	2,50	3,41	74	5-7,5	6,40	2,5-3,78	2,58	2,51
	Pa.94.71.1	12	10,4-11,7	11,05	2,6-3,9	3,03	3,64	88	3,9-7,8	6,06	1,95-3,9	2,88	2,10
	Pa. 95.21	10	7,8	7,8	2,6-3,25	5,35	1,45	90	3,9-6,5	5,17	2,6-3,25	2,42	1,85
	Pa. 95.01	08	7,8	7,8	2,5-3,9	3,5	2,22	92	3,9-7,8	4,49	1,95-3,25	2,35	2,27
	Pa. 09.02	12	9,1-11,7	9,96	2,6-5,2	3,25	3,06	88	3,9-10,4	6,88	2,6	2,95	2,33
	Pa. C8	18	7,9-11,7	9,75	2,6-3,9	3,25	3	82	5,2-7,8	6,95	2,6-3,25	6,5	1,06
	Pa.21.03	20	9,2-10,4	9,10	2,6-3,9	2,75	3,31	80	5,2-7,8	6,65	1,95-3,25	2,27	3,30
	Pa. 15.03	30	6,5-10,4	8,92	2,6-3,9	3,07	2,6	70	5,2-9,1	6,24	2,6	2,6	2,75
	Pa.10.03	28	7,8-10,4	8,72	2,6-5,2	3,25	2,68	72	3,9-7,8	5,99	1,95-3,25	2,44	2,45
	Mp.94.77.4	100	10,4-16,9	14,61	1,55-5,2	4,79	4,58	0	--	--	--	--	--
	Mp.94.14.7	100	10,4-15,6	13,54	3,9-5,2	4,69	2,88	0	--	--	--	--	--
	Mp1	62	7,8-14,3	11	5,2	5,2	2,12	38	7,8-10,4	9,1	5,2	5,2	1,75
	Mp. 08.03	62	7,8-10,4	9,1	3,25-5,2	4,22	2,15	38	3,9-5,2	4,55	2,6-3,25	2,92	1,56
Mp. 07.03	88	9,1-18,2	13,15	3,9-5,2	4,05	3,24	12	7,8	7,8	2,6-3,25	2,92	2,67	

**Tableau 6 .Dimensions des conidies de *Phoma sp* et *Ascochyta sp*. Isolats développés sur milieu Mathur à (20-25°)**

• Isolats à conidies 100% bicellulaires

Deux isolats d'*Ascochyta (M. pinodes)* présentent des conidies à 100% bicellulaires ; il s'agit des isolats Mp.94.77.4 et Mp.94.14.7, isolés de pois, et présentant les tailles les plus grandes d'environ 10,4µm-16,9 µm. Les conidies présentent une légère constriction au niveau de la septation.

• Isolats de conidies majoritairement bicellulaires

Les isolats de ce groupe ont une proportion de conidies bicellulaires variant entre 60 et 88%. Il s'agit des isolats Ata.98.03 isolé du bersim et les trois isolats Mp.07.03, Mp.08.03 et Mp1, isolés du pois. La longueur des conidies varie entre 4,55 et 10,4µm pour les monocellulaires et entre 7,8 et 18,2 µm pour les bicellulaires. L'isolat Ata.98.03 possède des conidies qui présentent des extrémités inégales en diamètre Le reste des isolats présentent des conidies de forme légèrement incurvé.

### 3.2.2. Variation de la taille des isolats

L'analyse statistique de la longueur des conidies monocellulaires et bicellulaires révèle une différence significative entre les isolats (tabl. 7), et fait ressortir 8 groupes homogènes par le test de Newman et Keuls au seuil de 5% (tabl. 8) :

Tableau 7: Analyse de la variance pour la mensuration des conidies des isolats étudiés :

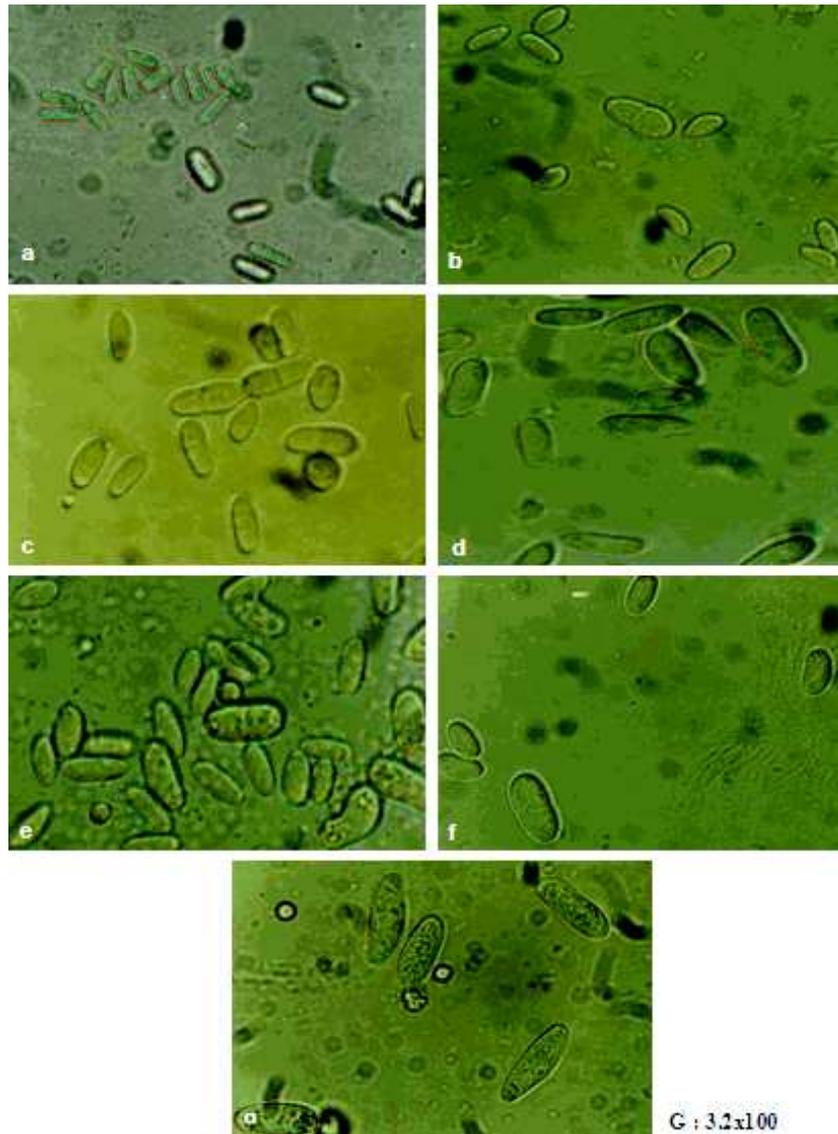
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Valeur critique pour F
Échantillon	4990,365042	25	226,8347746	108,260349	2,207783601
Colonnes	13625,0939	1	13625,0939	6502,78348	10,85602682
Interaction	1683,184025	25	76,50836479	36,5147818	2,207783601
A l'intérieur du groupe	4722,740918	2254	2,095271037		
Total	25021,38388	2299			

Libelles	N° isolats	Moyenne (µm)	Groupes Homogènes
Pluz 92.01	15	5,434	A
Pa95.21	14	5,746	B
Pa95.01	16	6,149	B
Pa C8	11	6,604	C
Pa 94.77.1	2	6,661	C
Pta 03.03	5	6,856	C
Papc 92.01	17	6,903	D
Ptp 95.03	22	7,033	D
Pa 15.03	6	7,046	D
Pta 98.04	26	7,072	D
Pa 94.03	10	7,098	D
Ptp 95.02	13	7,215	D
Pa 09.02	18	7,254	D E
Pa.10.03	9	7,404	D E
Pa 21.03	24	7,41	E
Pta 06.03	23	7,566	E
Papc 91.03	21	8,268	F
Papc 95.21	19	8,918	F
Pa pc 91.01	1	9,425	F
Pta 99.02	25	10,296	G
Mp 08.03	3	10,32	G
Mp1	12	11,544	H
Mp 07.03	8	12,65	H
Mp 94.14.7	4	12,73	H
Ata 98.03	20	13,754	H
Mp 94.77.4	7	14,325	H

**Tableau 8** : Classement et regroupement des isolats par le test de Newman et Keuls au seuil de 5%

**Groupe 1** : Ce groupe représenté par un seul isolat (P.Luz.92.01), est caractérisé par les plus petites conidies parmi tous les isolats étudiés, avec une longueur moyenne des conidies de 5,43  $\mu\text{m}$  et un diamètre moyen de 2,18 $\mu\text{m}$  (Fig. 3a) ; elles sont toutes monocellulaires et de forme cylindrique.

**Groupe 2** : Les deux isolats appartenant à ce groupe sont Pa.95.21 et Pa.95.01. Les conidies sont de petite taille avec des longueurs moyennes respectives de 5,74  $\mu\text{m}$



**Figure 3** : Aspect morphologique des conidies

- (a) : Conidies monocellulaires cylindriques, de l'isolat P. luz 92.01,
- (b) : Conidies monocellulaires et bicellulaires de l'isolat Pa 95.21,
- (c) : Conidies de l'isolats Pa 94.71.1 ;
- (d) : Conidies majoritairement monocellulaire de l'isolat Pta 03.03 ;

(e) Conidies de l'isolat Pta 98.04 ;

(f) : Conidies monocellulaires de l'isolat Pa 94.03 ;

(g) : Conidies monocellulaires de l'isolat Pta 06.03

et 6,14µm (Fig. 3b) ; elles sont de forme ovoïde, allongées et sont à 90% monocellulaires et 8 à 10% des conidies sont bicellulaires.

**Groupe 3** : On retrouve trois isolats dans ce groupe, Pa C8, Pa.94.77.1 isolés de pois (Fig. 3c), et Pta 03,03 isolé de trèfle d'alexandrie (Fig. 3d). Le pourcentage des conidies monocellulaires est compris entre 82 et 92% avec une taille moyenne de 6,60-6,85x3,05-4,87µm.

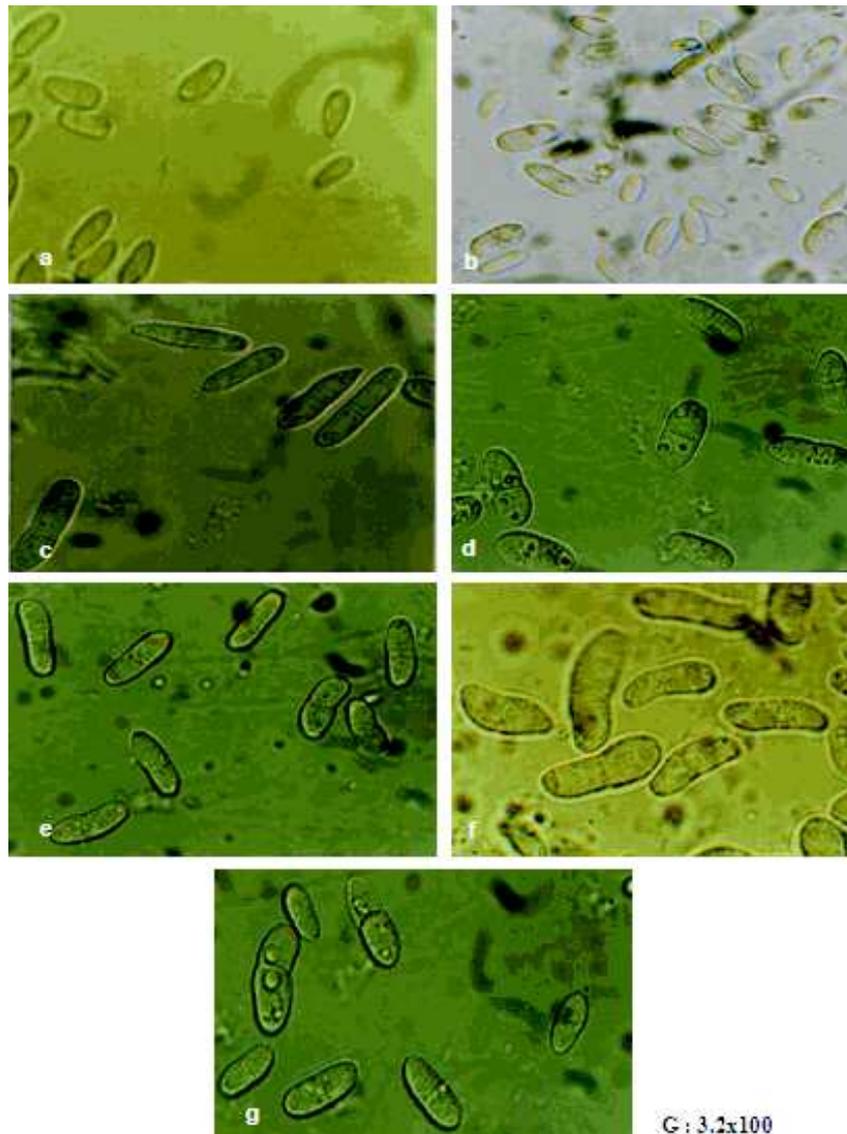
**Groupe 4** : Il regroupe six isolats à savoir PaPc.92.01, Ptp.95.03, Pa.15.03, Pta 98.04, Pa.94.03, et Ptp.95.02, qui proviennent de différentes Fabacées, tels que le pois chiche, le trèfle violet, le pois et le bersim. Les conidies sont de longueur moyenne comprise entre 6,90 et 7,21µm. Il est à noter que les conidies bicellulaires sont plus larges avec l'un des extrémités légèrement pointue et une légère constriction au niveau de la septation (Fig. 3e, f).

**Groupe 5** : Ce groupe comprend quatre isolats (le Pa.09.02, le Pa.10.03, le Pa.21.03 et le Pta.06.03) ; ils présentent des conidies de taille moyenne variant de 7,25 à 7,56 µm de longueur. Contrairement aux autres isolats appartenant à ce groupe, les conidies de l'isolat Pta.06.03 sont à 100% monocellulaires (Fig. 3g).

**Groupe 6** : Ce groupe rassemble les isolats de pois chiche PaPc 91.03, PaPc 95.21 et PaPc 91.01, dont la longueur varie de 8,26 à 9,42 µm ; leurs conidies sont majoritairement monocellulaires (Fig. 4a, b).

**Groupe 7** : Deux isolats représentent ce groupe (Pta.99.02 et Mp.08.03) dont le premier est caractérisé par des conidies qui sont plus grandes que celles des groupes précédents, avec une longueur moyenne de 10,29 µm et un diamètre de 3,56 µm. Elles sont à 66% monocellulaires et présentent une forme ovale à extrémité arrondie (Fig. 4c). Le deuxième isolat possède des conidies dont la longueur moyenne est de 10,32 µm avec un diamètre de 3,87µm. La majorité des conidies sont bicellulaires (Fig. 4d).

**Groupe 8** : Ce groupe rassemble les 5 isolats MP1, Mp.07.03, Mp.94.14.7, Ata.98.03 et Mp.94.77.4, isolés de pois et de bersim ; les conidies de ce groupe sont



**Figure 4:** Aspect morphologique des conidies (suite).

- (a)** : Conidies monocellulaires, de l'isolat PaPc. 91.03 ;
- (b)** : Conidies monocellulaires et bicellulaires de l'isolat PaPc.91.01
- (c)** : Conidies majoritairement monocellulaires de l'isolat Pta 99.02 ;
- (d)** : Conidies bicellulaires de l'isolat Mp 08.03 ;
- (e)** : Conidies bicellulaires de l'isolat Mp1;
- (f)** : Conidies bicellulaires de l'isolat Ata 98. 03;
- (g)** : Conidies majoritairement bicellulaires de l'isolat Mp 94.77.4

de grande taille avec des longueurs moyennes respectives de 11,54 $\mu$ m (Fig. 4e), 12.65  $\mu$ m, 12.73  $\mu$ m, 13,75  $\mu$ m (Fig. 4f) et 14,32  $\mu$ m (Fig. 4g)

Ces isolats se différencient nettement des autres par des conidies de grande taille majoritairement bicellulaires ; les conidies des isolats, Mp.94.77.4 et Mp.94.14.7 sont à 100% bicellulaires.

### 3.2.3. Discussion

De par la taille des conidies et leur pourcentage (monocellulaires ou bicellulaires), nous avons constaté une variabilité morphologique assez importante au sein des isolats étudiés. Cette diversité a été rapportée par de nombreux auteurs (Berthier, 1997 ; Bouznad & Corbiere, 1998 ; Monte & al, 1990 ; Aveskamp & al, 2008). La longueur des conidies variait de 3,9 à 17,5 µm avec un pourcentage de 8 à 100% de conidies monocellulaires.

Cette étude, montre que la majorité des isolats possèdent plus de 80% de conidies monocellulaires à l'exception des isolats Mp.94.77.4, Mp.94.14.7, Mp.08.03, Mp.07.03 obtenus de pois et l'isolat Ata.98.03 isolé de bersim, où la majorité des conidies sont bicellulaires. Les tailles les plus importantes sont observées chez les isolats de pois ; elles sont comprises dans l'intervalle 8-16 x 3-4.5 µm. Ces dimensions correspondent à ceux de l'espèce *M. pinodes* isolée de pois (Noordeloos & al, 1993). En ce qui concerne l'isolat Ata.98.03, la taille des conidies se rapproche de celle d'*Ascochyta trifolii* isolée du trèfle d'Alexandrie (Chorin, 1944). Une espèce comparable est décrite par Bond & Trassova (1931), indiquant une taille des conidies comprise entre 15-22x4,5-6 µm ; les conidies sont majoritairement bicellulaires. Cette espèce n'a pas été évoquée par Boerema lors de ses derniers travaux (2004). De ce fait, cet isolat mérite une attention particulière pour une confirmation de son identification.

Nos résultats montrent que l'isolat Pa.94.03 représentant le *P. pinodella* de référence, est regroupé avec plusieurs isolats : Pta.98.04, Pta.03.03 du bersim, les isolats de pois Pa.95.01, Pa.95.21, Pa.94.71.1, Pa 10.03 et avec les isolats du trèfle violet Ptp.95.03 et Ptp.95.02. Nous retrouvons dans ce même groupe les isolats de pois chiche PaPc 92.01, PaPc 91.01, PaPc 95.21, et PaPc.91.03. Tous ces isolats présentent des conidies en majorité monocellulaires (80%), avec des tailles de 5-8,5µm de longueur et 2,5-3,5µm de diamètre, avec cependant une légère différence au niveau du pourcentage des conidies monocellulaires. De par la forme et la dimension de leurs conidies, ces isolats se rapprochent donc de l'espèce *P. pinodella* (Sutton, 1980 ; Noordeloos & al, 1993 ; Boerema & al, 2004).

Par contre les deux isolats Pta.06.03 et Pta.99.02 du bersim présentent des conidies majoritairement monocellulaires, mais de longueur plus importante que les souches de *Phoma* habituellement décrites sur les *Fabaceae*.

Enfin, l'isolat P.Luz.92.01 ne présentant que des conidies monocellulaires, et qui montre la taille la plus petite par rapport au reste des isolats (3,9-7,8x2,6-3,25µm) ; il correspond à la taille des conidies des *P.m.var.medicaginis* selon Boerema & al (2004).

Il est important de signaler que les isolats qui se rapprochent du *P. pinodella* par la morphologie des conidies considérée comme un critère taxonomique important par Month & al (1990), ont montré une homogénéité entre eux. En effet, ils sont classés dans le même groupe, même s'ils sont d'origines géographiques et de plantes hôtes différentes. Il en est de même, pour les isolats appartenant à *M pinodes*, regroupés dans un groupe à part.

## 3.3. Analyse des isolats par la compatibilité végétative

---

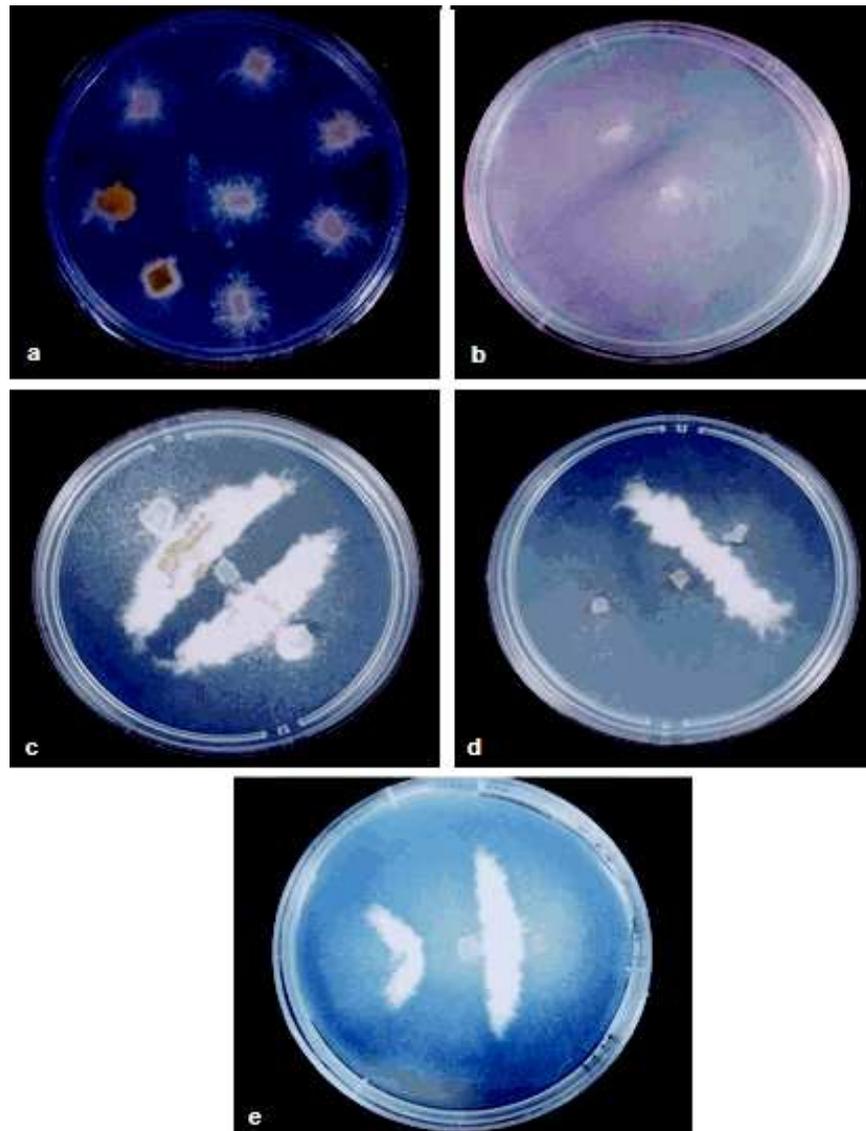
### 3.3.1. Sélection des mutants

Des mutants résistants au chlorate sont obtenus chez tous les isolats étudiés après 7 jours d'incubation. Ces mutants spontanés sont sélectionnés sur milieu minimum à base de chlorate à 40g/l (Fig. 5a), Par contre, aucun mutant n'a été obtenu à des concentrations

inférieures (15 g/l, 20 g/l, 25 g/l, 30 g/l, 35 g/l). Les mutants obtenus étaient plus abondants chez certains isolats que d'autres ; au total, 124 mutants sont sélectionnés.

Code des isolats	Nit M	Nit 3	Nit 1	Total			
Pta.06.03	1	100	0	0	0	0	1
Pta.03.03	4	40	4	40	2	20	10
Pta.99.02	2	50	0	0	2	50	4
Pta.98.04	0	0	0	0	1	100	1
Ata.98.03	2	28,57	1	14,28	4	57,14	7
Ptp.95.03	2	33,33	1	16,66	3	50	6
Ptp.95.02	0	0	0	0	1	100	1
Pluz.92.01	1	100	0	0	0	0	1
PaPc.92.01 (Oued smar)	2	50	1	25	1	25	4
PaPc.91.01 (Maroc)	0	0	0	0	1	100	1
PaPc.91.01 (Tessala)	2	28,57	1	14,28	4	57,14	7
Papc.91.03 (Miliana)	1	33,33	0	0	2	66,66	3
Pa.94.03	1	100	0	0	0	0	1
Pa.94.71.1	0	0	0	0	1	100	1
Pa.95.21	1	20	1	20	3	60	5
Pa.95.01	0	0	1	50	1	50	2
Pa.09.02	2	33,33	1	16,66	3	50	6
Pa.c8	0	0	1	100	0	0	1
Pa.21.03	1	50	0	0	1	50	2
Pa.15.03	1	50	1	50	0	0	2
Pa.10.03	2	33,33	1	16,66	3	50	6
Mp.94.14.7	5	35,71	2	14,28	7	50	14
Mp.94.77.4	2	15,38	0	0	11	84,61	13
Mp1	3	33,33	1	11,11	5	55,55	9
Mp.08.03	1	20	2	40	2	40	5
Mp.07.03	3	27,27	4	36,36	4	36,36	11
Total	39	31,45	23	18,54	62	50	124

*Tableau 9 : Nombre de mutants Nit des isolats étudiés obtenus sur les milieux de caractérisation*



**Figure 5 :** *Mutants chlorate résistants des isolats étudiés*

- (a) : Mycélium chlorate résistant d'un mutant « nit » sur milieu minimum,
- (b) : Réaction d'auto incompatibilité entre des mutants de l'isolat Pta.99.02 :
- (c) : Réaction d'auto compatibilité entre des mutants « nit 1 »\_ « nit M »\_ « nit 3 », de l'isolat P. luz 92.01,
- (d) : Formation d'hétérocaryon entre des mutants « nit » de l'isolat Mp 08.03 et des mutants « nit » de l'isolat Mp.07.03,
- (e) : Formation d'hétérocaryon entre des mutants « nit » de l'isolat Pta. 03.03 et des mutants « nit » de l'isolat Ptp.95. 02,

isolats	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9	I10	I11	I12	I13	I14	I15	I16	I17	I18	I19	I20	I21	I22	I23	I24	I25	I26
I1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I2		+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I3			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I4				+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I5					+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I6						+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I7							-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I8								+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I9									-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I10										+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I11											+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I12												+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I13													+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I14														+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I15															+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I16																+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I17																	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I18																		+	-	-	-	-	-	-	-	-
I19																			+	-	-	-	-	-	-	-
I20																				+	-	-	-	-	-	-
I21																					+	-	-	-	-	-
I22																						+	-	-	-	-
I23																							+	-	-	-
I24																								+	-	-
I25																									+	-
I26																										+

I1 : Pta.06.03, I2 : Pta.03.03, I3 : Pta.99.02, I4 : Pta.98.04, I5 : Ata.98.03, I6 : Ptp.95.03, I7 : Ptp. 95.02, I8 : P Luz.92.01, I9 : PaPc.92.01, I10 : PaPc.95.21, I11 : PaPc.91.01, I12 : PaPc.91.03, I13 : Pa.94.03, I14 : Pa.94.77.1, I15 : Pa.95.21, I16 : Pa.95.01, I17 : Pa.09.02, I18 : Pa CS, I19 : Pa.21.03, I20 : Pa.15.03, I21 : Pa.10.03, I22 : Mp.94.77.4, I23 : Mp1, I24 : Mp.08.03, I25 : Mp.07.03, I26 : Mp.94.14.7.

Tableau 10 : Résultats des confrontations entre les mutants des isolats étudiés

### 3.3.2. Caractérisation des mutants « nit »

La mise en évidence des mutants non utilisateurs de nitrates, obtenus à partir de chaque isolat, sur les milieux minimums à base du nitrate, nitrite et de l'hypoxantine, nous ont permis de constater que 50% d'entre eux sont des « nit1 », 18,54% des

« nit3 » et 31,45% des « nit M ». Tous ces pourcentages sont présentés dans le tableau 9.

Nous constatons que tous les isolats analysés présentent au moins un mutant de type nitM et nit1 ou nit3, avec des pourcentages qui restent variables d'un isolat à un autre. Cependant, pour l'ensemble des isolats, le nombre de mutants « nit1 » est toujours supérieur à celui des autres mutants.

### 3.3.3. Confrontations des mutants « nit » et identification des groupes de compatibilité végétative (GCV)

La confrontation des mutants complémentaires « nit M », « nit 1 » et ou « nit 3 » provenant des différents isolats est effectuée selon toutes les combinaisons possibles. Il convient de signaler que les isolats Ptp 95.02, Pta99.02, PaPc92.01, Pa95.01, et Pa10.03, présente chacun une auto- incompatibilité (Fig. 5b). De ce fait, ces isolats sont écartés pour la suite du test. En ce qui concerne les autres isolats, nous avons conclu une auto compatibilité, c'est-à-dire que la confrontation des mutants complémentaires issus du même isolat, conduit toujours à la formation d'un hétérocaryon stable (Fig. 5c) ; les isolats auto compatibles ont fait l'objet de la suite de cette partie d'étude.

Les résultats des différentes confrontations entre mutants complémentaires des isolats sont mentionnés dans le tableau 10. Une seule confrontation compatible est obtenue chez les isolats du genre *Phoma*, et quatre confrontations compatibles chez certains isolats reconnus comme *M. pinodes*.

Par rapport au nombre de mutants obtenus, nous considérons que les résultats montrent peu de compatibilité entre les isolats étudiés. Seuls les isolats Mp.07.03, et Mp.08.03 (Fig. 5d) sont compatibles. Ce dernier est compatible également avec Mp 94.77.4 et Mp 94.14.7. Ces quatre isolats appartiennent donc au même groupe de compatibilité végétative. Par ailleurs, les isolats Ptp.95.02 et Pta.03.03 sont également compatibles (Fig. 5e), et forment à eux seuls un autre groupe de compatibilité végétative.

### 3.3.4. Discussion

Notre étude sur la compatibilité végétative de quelques isolats provenant de Fabacées, nous a permis dans un premier temps, d'obtenir des mutants résistants au chlorate pour les trois types de mutants nit (nit M, nit 1, nit 3). Cependant, le pourcentage des mutants nit3 obtenu varie d'un isolat à un autre, mais toujours en plus faible fréquence par rapport aux autres types de mutants. Ce résultat coïncide avec celui obtenu par de nombreux travaux sur plusieurs champignons, où la compatibilité végétative est largement étudiée, notamment sur *Fusarium oxysporum* sp. *albedinis* (Tantaoui & Boisson, 1991), sur *Fusarium oxysporum* sp. *melonis* (Gennari & d'Ercole, 1994), sur *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici* (Henni & al, 1998), et sur *Fusarium oxysporum* sp. *lentis* (Belabid, 2001); le pourcentage de nit3 obtenu était toujours faible.

Cependant dans notre cas, les confrontations des mutants « nit » des différents isolats étudiés, ont permis la mise en évidence uniquement de deux groupes de compatibilité végétative. Le premier groupe rassemble le Mp1, Mp 07.03, Mp 94.14.7 et Mp.94.77.4, parmi les isolats d'*Ascochyta* et le deuxième groupe rassemble le Pta 03.03 et le Ptp 95.02 parmi les isolats de *Phoma*. Ainsi, à l'issue de cette étude, deux groupes de compatibilité végétative sont mis en évidence.

Même si une faible compatibilité végétative est notée chez les isolats étudiés, cette étude a permis d'établir un protocole adéquat pour l'obtention des mutants résistants au chlorate chez les isolats appartenant du genre *Phoma* et *Ascochyta*, alors que Fugral-Wegrzycka & Wegrzycki (2009) avaient rapporté qu'il n'est pas possible d'obtenir des mutants et des groupes de compatibilité végétative par l'utilisation de test de complémentation de mutant nit. Comme cette méthode a montré son intérêt dans l'étude de la diversité génétique et la caractérisation des champignons phytopathogènes, d'autres études méritent d'être poursuivies par la même approche phénotypique.

### 3.4. Analyse du polymorphisme génétique des isolats de *Phoma* spp. et *Ascchyta* spp. par RAPD

#### 3.4.1. Evaluation de la qualité de l'ADN extrait

L'extraction de l'ADN a été réalisée pour tous les isolats en utilisant un protocole d'extraction à base de SDS, de Tris-HCl et d'EDTA. L'évaluation de la pureté des extraits, s'est basée sur la visualisation des bandes sur gel d'agarose à 1 %, et le dosage au spectrophotomètre (Do 260/280). Cette visualisation a révélé la présence de bandes d'une bonne intensité pour la quasi totalité des isolats testés, cependant une légère dégradation de l'ADN a été observé (Smear). Les concentrations obtenues sont supérieures à 10ng/µl (tabl. 11), et peuvent être utilisées pour le marqueur RAPD. Ces résultats confirment que le protocole choisi est bien adapté aux espèces étudiées.

Isolats	DO 260 nm	DO 280 nm	DO 260/DO 280	Concentration
				d'ADN (µg/ml)
Ata 98.03	0,0018	0,0023	1,5	17
Pta 99.02	0,0022	0,0022	1,6	17,5
Pta 98.04	0,0028	0,0021	1,8	19
Pta 06.03	0,0024	0,0021	1,7	18
Pta 06.03	0,0004	0,0014	1,6	11
Ptp 95.03	0,0026	0,0022	1,7	18,5
Ptp 95.02	0,0028	0,0021	1,8	19
Papc 91.03	0,001	0,0017	1,6	14
Papc 92.01	0,0026	0,0022	1,7	18,5
Papc 95.21	0,0012	0,0022	1,5	15
Papc 91.01	0,0004	0,0015	1,5	11
PLuz 92.01	0,0006	0,0016	1,5	12
Pa 94.03	0,0008	0,0017	1,5	13
Pa 95.21	0,0012	0,0019	1,6	15
Pa 95.01	0,0004	0,0016	1,4	11
Pa 09.02	0,0022	0,0022	1,6	17,5
Pa 10.03	0,0004	0,0015	1,5	11
Pa C8	0,0006	0,0016	1,5	12
Pa 21.03	0,0004	0,0016	1,4	11
Pa 15.03	0,0008	0,0017	1,5	13
Pa 94.71.1	0,0006	0,0016	1,5	12
Mp 94.77.4	0,0014	0,002	1,6	16
Mp 94.14.7	0,0004	0,0016	1,4	11
Mp 1	0,001	0,0019	1,5	14
Mp 08.03	0,0014	0,0021	1,5	16
Mp 07.03	0,0004	0,0016	1,4	11

Tableau 11: Concentration et pureté de l'ADN des isolats déterminée par spectrophotométrie

#### 3.4.2. Analyse des isolats étudiés par RAPD

De par les profils obtenus avec les deux amorces C13 et C18, les isolats ont présenté un grand polymorphisme. Ces deux amorces ont permis l'amplification de 13 et 10 bandes

respectivement (Annexe 5,6), selon des intensités variables, et se sont révélées très discriminantes pour l'analyse des isolats appartenant aux genres *Phoma* et *Ascochyta*.

### 3.4.2.1. Profils obtenus avec l'amorce C13

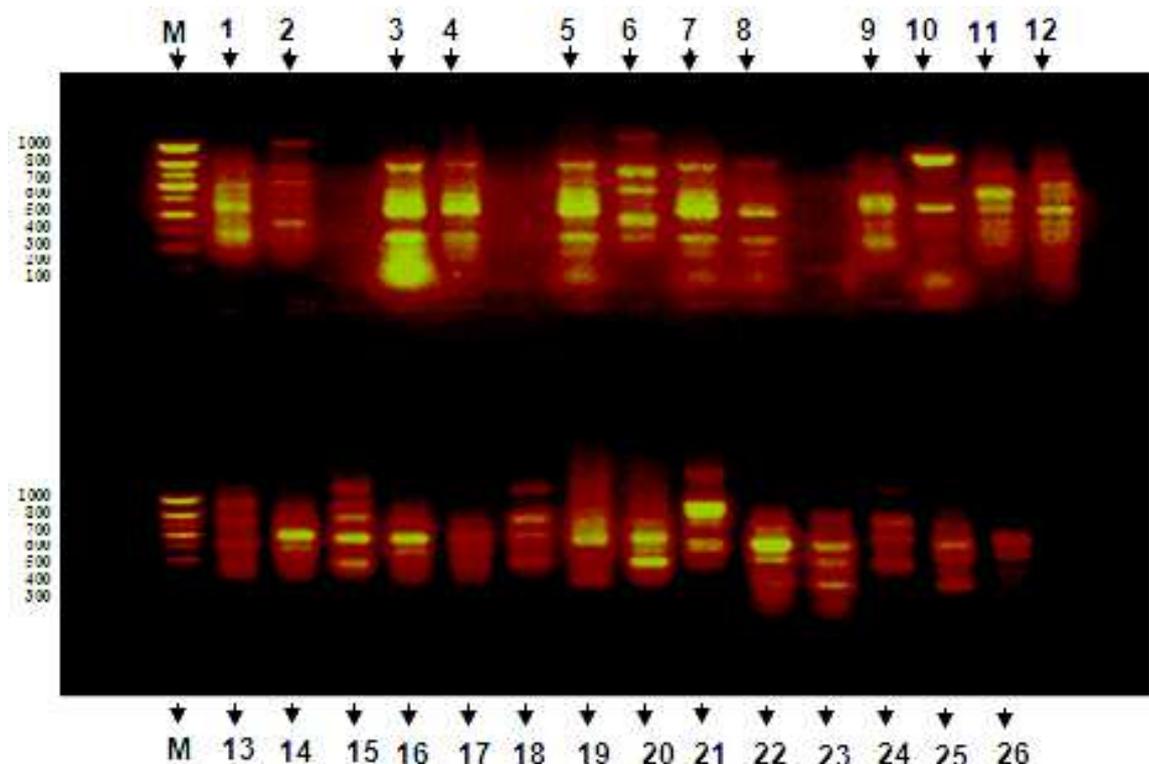
Les profils obtenus présentent une variation importante avec une taille des bandes qui varie entre 100 et plus de 1000 pb (Fig. 7). La bande de taille comprise entre 300-400 pb est commune ou spécifique à un certain nombre d'isolats appartenant au genre *Ascochyta*, Mp 94.14.7, Mp 08.03, Mp1 ainsi qu'à l'isolat Mp 94.77.4 reconnu comme *M. pinodes* de référence. Il est à noter que tous ces isolats ont été obtenus de la même plante hôte, le pois. D'autres isolats apparentés au *P. pinodella* ont montré des profils comparables pour ce groupe. C'est le cas des isolats Pa. 95.21 et Pa.95.01 d'une part et les isolats Pa.21.03 et Pa.09.02 d'autre part. Le reste des isolats, a présenté chacun un profil distinct.

Le dendrogramme réalisé sur la base de l'indice de similarité de Jaccard's a permis de regrouper les isolats en plusieurs classes. A 50% de similarité, 11 groupes peuvent être distingués (Fig. 8), dont les principaux sont :

**Groupe1** : Il rassemble quatre isolats dont trois isolats de pois (Pa 94.71.1, Pa 94.03, Pa C8), et un isolat de pois chiche (Pa pc 91.01). Bien qu'ils soient isolés d'espèces végétales différentes, ces isolats présentent beaucoup de similitude (plus de 60%).

**Groupe 2** : Il est constitué de cinq isolats (Mp 07.03, Mp 94.77.4, Mp1, Mp 94.14.7 et Mp 08.03), présentant une grande similitude. Au seuil de coupure d'environ 50% de similarité une diversité intra-spécifique a été constatée. Tous ces isolats ont été obtenus de la même plante hôte, le pois.

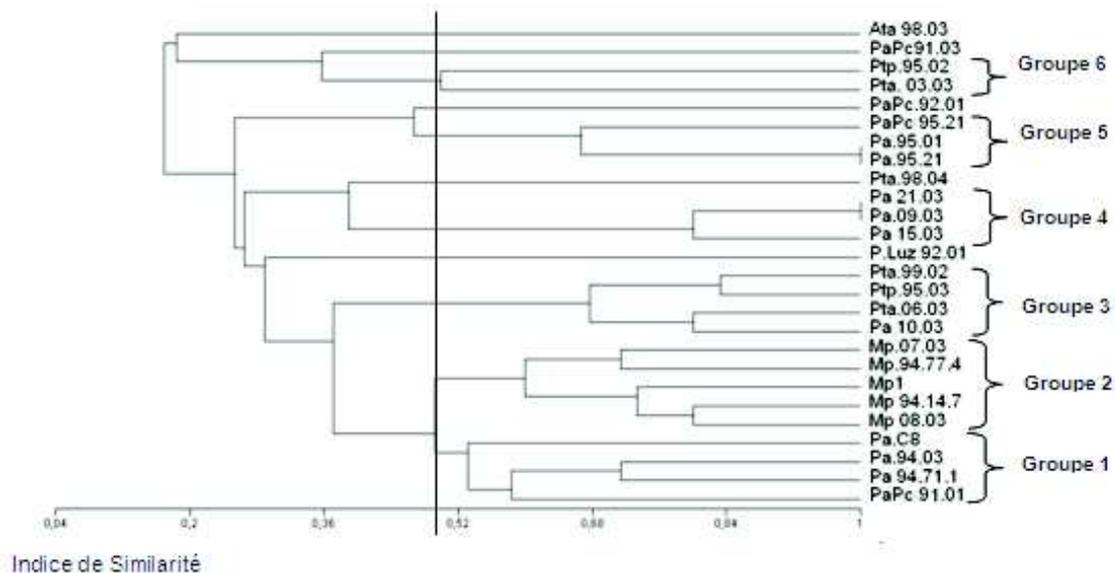
**Groupe3** : Il comprend quatre isolats, et constitué de deux sous groupes : Pa 10.03 et Pta 06.03 d'une part, et les isolats Ptp 95.03 et Pta 99.02 d'autre part. Nous



**Figure 7:** Profils électrophorétiques obtenus avec l'amorce C13.

**M :** Marqueur,

- 1: PaPc 91.01,
- 2: Pa 94.71.1,
- 3: Mp 08.03,
- 4: Mp 94.14.7,
- 5: Pta 03.03,
- 6: Pa 15.03,
- 7: Mp 94.77.4,
- 8: Mp 07.03,
- 9: Pa 10.03,
- 10: Pa 94.03,
- 11: Pa C8,
- 12: Mp1,
- 13: Ptp 95.02,
- 14: Pa 95.21,
- 15: PLuz 92.01,
- 16: Pa 95.01,
- 17:., PaPc 92.01
- 18: Pa 09.02,
- 19: PaPc 95.21,
- 20: Ata 98.03,
- 21: PaPc 91.03,
- 22: Ptp 95.03,
- 23: Pta 06.03,
- 24: Pa 21.03,
- 25: Pta 99.02,
- 26 : Pta.98. 04



**Figure 8 :** Dendrogramme obtenu après analyse des produits d'amplification des 26 isolats avec l'amorce C13 en utilisant l'indice de similarité de Jaccard par la méthode UPGMA.

remarquons que ces isolats sont d'origines géographiques et de plantes hôtes différentes, mais qui sont regroupés dans un même ensemble.

**Groupe 4** : Il est composé de trois isolats de *Phoma* (Pa.15.03, Pa.09.02, Pa.21.03). L'isolat Pa 15.03, dont le profil est assez semblable avec les isolats Pa 09.02 et Pa 21.03 avec 80% de similarité. Les deux derniers isolats sont identiques, à une similarité relative de 100%.

**Groupe 5** : Il comprend 2 isolats Pa 95.21 et Pa 95.01 isolé de pois, présentant des profils identiques à 100% et un troisième isolat Pa pc 95.21, isolé de pois chiche, avec seulement 65% de similitude.

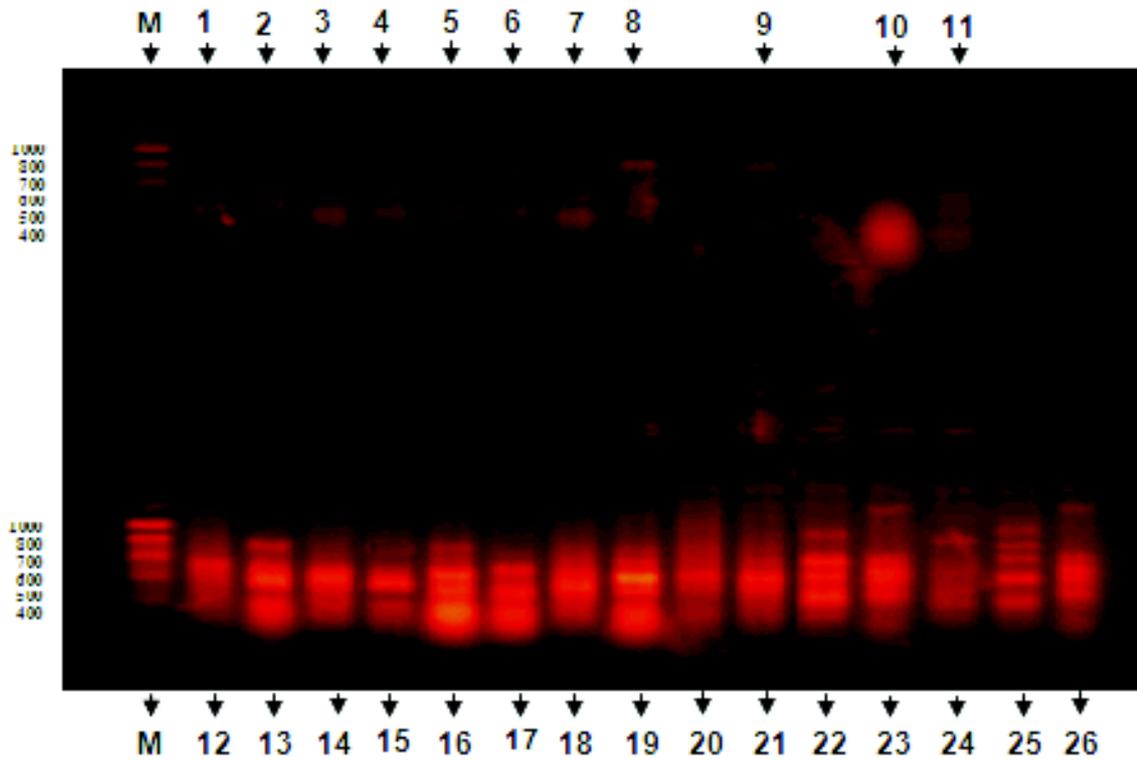
**Groupe 6** : Il regroupe deux isolats Pta.03.03, isolés sur bersim et l'isolat Ptp.95.02 provenant du trèfle violet.

Les 5 isolats restant, constitue chacun un groupe distinct à un indice de similitude de 50%, et sont dispersés individuellement dans le dendrogramme. Ainsi l'isolat Ata.98.03 à conidies bicellulaires comparable au genre *Ascochyta* se distingue nettement du reste des isolats, avec un profil particulier. Enfin, les isolats P.Luz 92.01 isolé de luzerne (*P. m.var.medicaginis* de référence) ; Pta 98.04 et Pta 03.03 isolés de bersim, Ptp 95.02 isolé de trèfle violet, et Papc 91.03 isolé de pois chiche possèdent très peu de similitude entre eux. Une diversité inter spécifique importante est donc notée au sein des isolats appartenant au genre *Phoma*.

### 3.4.2.2. Profils obtenus avec l'amorce C18

Cette amorce révèle un important polymorphisme génétique (Fig. 9), où 10 bandes de 300 à 1000 pb ont été amplifiées. La bande 700 pb est commune aux isolats Ptp 95.02 (trèfle violet) et Pa 95.01 (pois). Les deux isolats Pa 94.03 et Pa C8 n'ont pas produit de bandes, alors que le reste des isolats ont montré une grande diversité.

Le dendrogramme obtenu avec l'amorce C18 au seuil de coupure de 50% (Fig. 10) permet de distinguer clairement l'isolat du bersim (Ata 98.03) du reste des isolats étudiés.

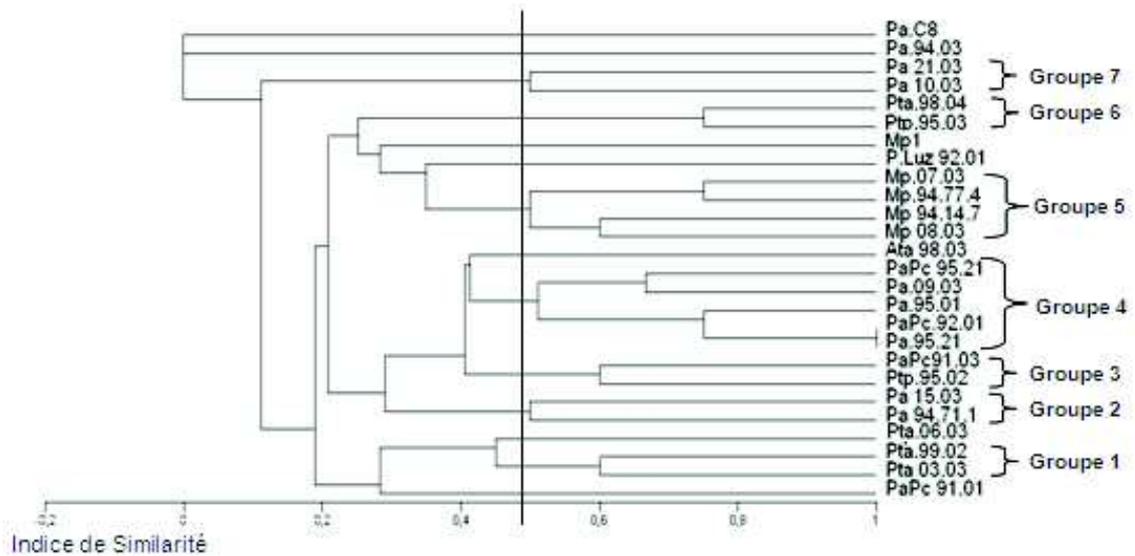


*Figure 9 : Profils électrophorétiques obtenus avec l'amorce C18.*

**M** : Marqueur,

- **1**: PaPc 91.01,
- **2** : Pa 94.71.1,
- **3**: Mp 08.03,
- **4**: Mp 94.14.7,
- **5**: Pta 03.03,
- **6**: Pa 15.03,
- **7**: Mp 94.77.4,
- **8**: Mp 07.03,
- **9**: Pa 10.03,
- **10**: Pa 94.03,
- **11**: Pa C8,
- **12**: Mp1,
- **13**: Ptp 95.02,
- **14**: Pa 95.21,
- **15**: PLuz 92.01,
- **16**: Pa 95.01,
- **17**: PaPc 92.01,
- **18**: Pa 09.02,
- **19**: PaPc 95.21,
- **20**: Ata 98.03,
- **21**: PaPc 91.03,
- **22**: Ptp 95.03,
- **23**: Pta 06.03,
- **24**: Pa 21.03,

- **25:** Pta 99.02,
- **26:** Pta 98.04.



**Figure 10 :** Dendrogramme obtenu après analyse des produits d'amplification des 26 isolats avec l'amorce C18 en utilisant l'indice de similarité de Jaccard par la méthode UPGMA.

A ce seuil de coupure, le dendrogramme classe des isolats issus de différentes plantes hôtes dans un même groupe. En effet, les isolats de pois chiche PaPc 91.03 et PaPc 95.21 sont réunis dans le même groupe que celui des isolats de pois Pa.95.21, Pa.95.01 et Pa.09.03. De même pour l'isolat Ptp.95.03 de trèfle violet qui se place avec l'isolat de bersim Pta.98.04. Par ailleurs, l'isolat P.luz.92.01 apparenté au *P. m.var.medicaginis*, a été classé séparément du reste des isolats.

Sept groupes se distinguent avec 50% de similitude :

**Groupe1 :** Rassemble les isolats Pta 03.03, Pta 99.02, isolés de bersim.

**Groupe2 :** Réunit l'isolat Pa 94.71.1 et l'isolat Pa 15.03 obtenus de pois.

**Groupe 3 :** Comprend l'isolat Ptp 95.02 (trèfle violet) et PaPc 91.03 isolé de pois chiche.

**Groupe 4 :** Regroupe la plupart des isolats de pois tel que Pa 95.21, Pa 95.01, Pa 09.02 et les deux isolats de pois chiche PaPc 92.01 et PaPc 95.21. Les deux isolats Pa 95.21 et Pa pc 91.03 sont identiques à 100% de similitude.

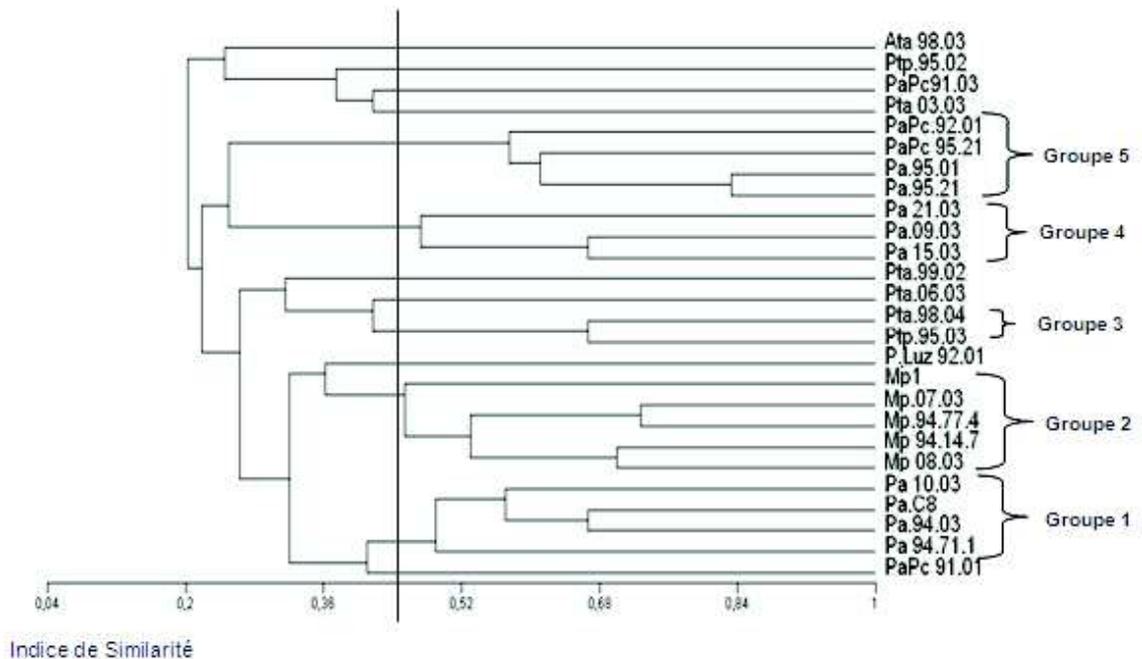
**Groupe 5 :** Rassemble presque la totalité des isolats identifiés comme *M. pinodes* isolés de pois, y compris l'isolat de référence Mp 94.77.4. Deux sous groupes sont définis au sein de ce groupe, dont le premier rassemble le Mp 08.03 (Algérie) et l'isolat Mp 94.14.7 (France) à 60% de similarité. Le deuxième rassemble les deux isolats Mp 94.77.4 et Mp 07.03 isolés de pois à 78% de similitude.

**Groupe 6 :** Comprend l'isolat Pta 98.04 isolé de trèfle d'Alexandrie et l'isolat Ptp 95.03 isolé de trèfle violet, qui sont identifiés comme *P. pinodella* selon les critères morphologiques.

**Groupe 7 :** Est composé de l'isolat Pa 10.03 et Pa 21.03 isolés du pois.

### 3.4.2.3. Profils obtenus avec les deux amorces combinées C13 et C18

En intégrant les profils des amplifications obtenus avec les deux amorces C13 et C18 (Annexe 7), le dendrogramme permet un regroupement des isolats plus ou moins similaires à ceux obtenus avec les deux amorces séparées (Fig. 11). Cependant, quelques différences apparaissent pour certains isolats. Ainsi, en considérant les isolats ayant au moins 50% de similitude, cinq groupes peuvent être distingués:



**Figure 11** : Dendrogramme obtenu avec les deux amorces combinées C13 et C18 en utilisant l'indice de similarité de Jaccard par la méthode UPGMA.

**Groupe 1** : regroupe les cinq isolats de *P. Pinodella* : Pa Pc 91.01, Pa 94.71.1, Pa 94.03, Pa.C8 et Pa 10.03.

**Groupe 2** : Tous les isolats de *M. pinodes* sont réunis au sein de ce groupe, avec un degré de similarité proche de 50 %.

**Groupe 3** : Dans ce groupe, les deux isolats du trèfle violet et le trèfle d'Alexandrie à savoir, le Ptp 95.03 et le Pta 98.04 présentent une similarité de 67 %, étant reconnus comme *P. pinodella* selon la morphologie des conidies, ils s'associent avec les isolats Pta 06.03, Pta 03.03 et Ptp 95.02.

**Groupe 4** : comprend les trois isolats de *P. pinodella* isolés du pois à savoir le Pa 21.03, le Pa 09.03 et le Pa 15.03, avec un rapprochement à 68 % de similitude des deux derniers.

**Groupe 5** : Réunit les deux isolats de *P. pinodella* du pois Pa 95.01 et Pa 95.21, avec deux autres isolats provenant de plantes hôtes autres que le pois, à savoir PaPc 95.21 et PaPc 92.01 isolés de pois chiche.

#### 3.4.2.4. Comparaison des profils des isolats de *Phoma* spp. avec les profils de quelques espèces d'*Ascochyta*

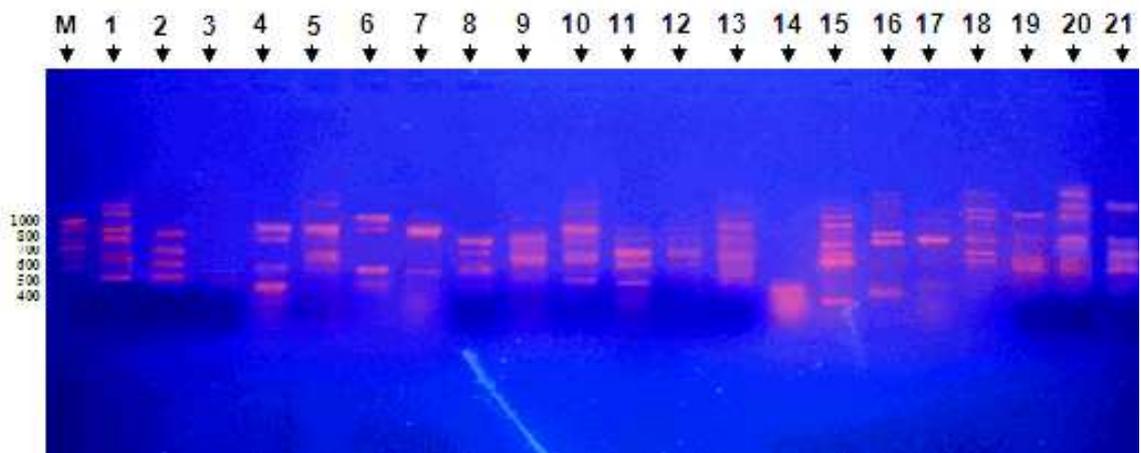
Dans cette étude, sont comparés les isolats ayant affiché des caractères morphologiques proches et une spécificité parasitaire élevée pour les comparer avec quelques espèces d'*Ascochyta* inféodées aux Fabacées ; *A. pisi*, *A. fabae*, *A. lentis*, *A. rabiei*, et *A. viceae*.

L'amorce C13 a été la seule testée et a révélé un grand polymorphisme pour la majorité des isolats étudiés (Fig. 12) ; les isolats Ata 98.03 et Pta 03.03 n'ont pas été amplifiés.

Le dendrogramme élaboré à partir des profils générés par cette amorce (Annexe 8) permet de séparer les isolats de *Phoma* de ceux des *Ascochyta* en deux ensembles au seuil de coupure de 18% de similitude (Fig. 13). En particulier certains isolats tels que Mp 94.77.4 (pois), *A. lentis* (lentille), *A. viciae* (vesce) et *A. fabae* (fève) présentent des profils particuliers et assez proches. L'exception est faite pour l'isolat *A. rabiei* qui se retrouve dans l'ensemble des *Phoma*, mais ne se rapproche à aucun de ces isolats au seuil de similarité de 50%.

Ainsi la majorité des isolats de *Phoma* se répartissent en quatre groupes:

**Groupe1** : Ptp 95.03 avec le Pa.95.21.

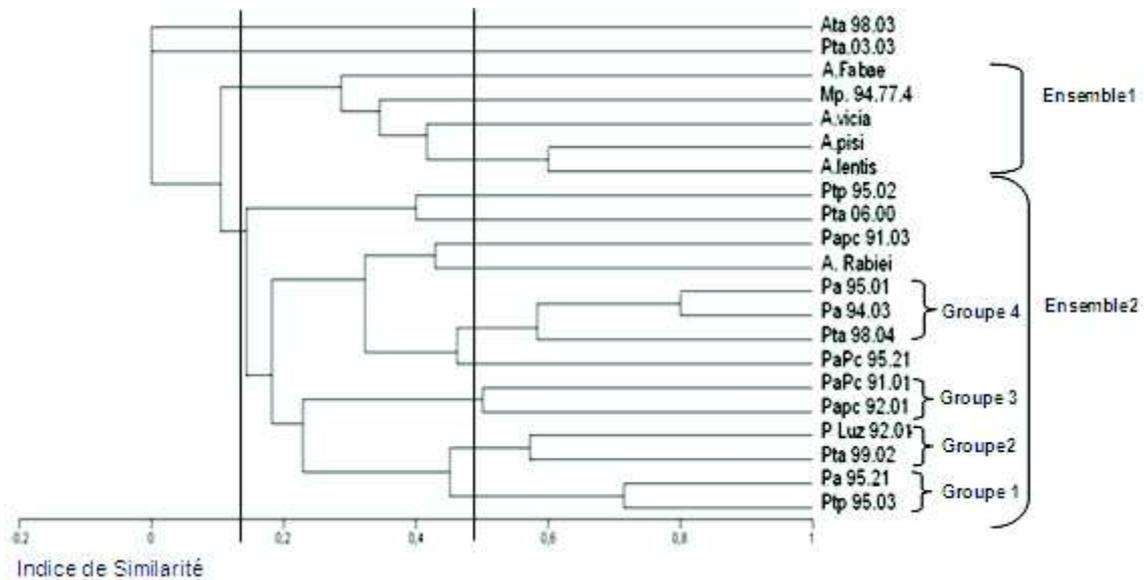


**Figure 12** : Profils électrophorétiques obtenus avec l'amorce C13 de 16 isolats de la collection avec quelques espèces d'*Ascochyta*.

**M** : Marqueur,

- 1 : Ptp 95.03,
- 2 : Pta 98.04,
- 3 : Ata.98.03,
- 4 : Pta 06.03,
- 5 : PaPc 91.03,
- 6 : PaPc 91.01,
- 7 : PaPc 92.01,
- 8 : PaPc 95.21
- 9 : Ptp 95.02,
- 10 : Pta 99.02,
- 11 : Pa 94.03,
- 12 : Pa 95.01,
- 13 : Pa 95.21,
- 14 : Pta 03.03,
- 15 : *A. lentis*,
- 16 : *A. fabae*,
- 17 : *A. viciae*,

- 18 : A rabiei,
- 19 : A pisi,
- 20 : Mp 94.77.4,
- 21 : P.luz. 92.01



**Figure 13:** Dendrogramme obtenu après analyse des produits d'amplification des isolats de *Phoma* spp avec quelques espèces d'*Ascochyta* avec l'amorce C13 en utilisant l'indice de similarité de Jaccard par la méthode UPGMA.

**Groupe2 :** P.luz 92.01 (*P.m.var. medicaginis*), avec Pta 99.02.

**Groupe3 :** Papc.92.01 avec Papc.91.01.

**Groupe4 :** Nous retrouvons dans ce groupe les isolats de *P. pinodella*, à savoir, Pta.98.04, Pa 94.03 de référence et Pa 95.01. Le reste des isolats sont dispersés individuellement dans le dendrogramme obtenu.

### 3.4.3. Discussion

L'étude du polymorphisme génétique des isolats de *Phoma* spp. et *Ascochyta* spp. isolés de bersim, trèfle violet, luzerne, pois et pois chiche, a été réalisée dans un premier temps, à l'aide des deux amorces C13 et C18. Dans un deuxième temps, l'étude est complétée avec l'amorce C13 pour les isolats ayant montrés les résultats les plus intéressants lors de la caractérisation morphologique (conidies) en comparaison avec les espèces d'*Ascochyta* des *Fabaceae*. Les résultats obtenus ont révélé un important polymorphisme génétique avec ces deux amorces reflétant ainsi l'existence d'une variabilité génétique relativement importante chez ces deux genres, comme souligné par les travaux de Bouznad & al (1995), Bouznad & al (1998) et Talhinhos & al (2002). Cette variabilité suppose la forte probabilité de l'existence d'autres espèces inféodées aux *Fabaceae* fourragères non encore décrites, comme l'a été proposé par Berthier (1997), Blossier (1997) et Boumediene (2003).

En effet, le dendrogramme obtenu avec les deux amorces combinées C13 et C18 appliquées sur la totalité des isolats étudiés a séparé ces derniers en quatre groupes :

Le premier rassemble les isolats de *Phoma* spp. du pois incluant l'isolat de référence *P. pinodella*, Pa 94.03.

Le deuxième groupe rassemble les isolats d'*Ascochyta* spp. de pois dans un groupe homogène (quelque soit leur origine), y compris *M. pinodes* de référence Mp 94.77.4.

Le troisième groupe réunit l'isolat Ptp 95.03 considéré comme un *P. pinodella* et le Pta 98.04 isolé de bersim qui est également identifié comme *P. pinodella* selon la morphologie des pycniospores et ses attaques spécifiques sur le pois, résultat déjà rapporté par Ghiat (2001).

Le quatrième groupe rassemble les isolats de pois : Pa 21.03, Pa 15.03 et Pa 09.03, isolés en Algérie.

L'analyse des isolats étudiés par RAPD confirme que l'isolat Ata 98.03 isolé du bersim est génétiquement éloigné des isolats apparentés au *P. pinodella* et *P.m. var. medicaginis* ainsi que des espèces du genre *Ascochyta*. Ces résultats consolident l'hypothèse de son appartenance à une espèce non encore décrite sur *Fabaceae* (Ghiat & al, 2009).

Les autres isolats de bersim, Pta 99.02, Pta 06.03 et le Pta03.03 ont présenté une diversité génétique importante, qui s'est traduite par leur dispersion au sein du dendrogramme obtenu. Ce résultat suggère la présence d'au moins une espèce non encore décrite sur *Fabaceae* fourragères, résultat déjà rapporté par Boumediene (2003).

En revanche, les profils générés par l'amorce C13 ont permis de différencier les principales espèces d'*Ascochyta* des légumineuses alimentaires (*A. pisi*, *A. fabae*, *A. viceae* et *A. lentis*). De plus, les isolats apparentés aux espèces de *Phoma* sont également bien distingués des espèces d'*Ascochyta*, résultats rapportés par Bouznad & al (1998), Boumediene (2003) et Irinyi & al (2007). Enfin, l'isolat *A. pisi* se distingue des isolats de *M. pinodes* et *P. pinodella* confirmant les résultats obtenus par Bretag & Ramsey (2001).

En particulier les différences obtenues entre les isolats de *P. pinodella* et ceux de *M. pinodes*, avec les amorces C13 et C18, confirment les résultats rapportés par Bouznad & al (1995) et Onfroy & al (1999), indiquant que la distinction de ces deux espèces peut être établie par l'utilisation de la RAPD. Toutefois ce résultat est en contradiction avec celui de Fethie & al (2003), rapportant que ces deux espèces sont étroitement liées et qu'il est difficile de les différencier par RAPD.

La comparaison des résultats obtenus par l'analyse des profils RAPD avec ceux obtenus par l'étude de la morphologie des pycniospores, montre qu'une similitude assez importante est révélée en rapport avec la taille des conidies. En effet, les isolats Mp 08.03, Mp 07.03, Mp1 ayant présenté les tailles de spores les plus grandes, ont été classés dans le même groupe homogène. Par ailleurs, l'isolat

Tâches sur feuilles Nécroses du collet racines	Ata.98.03	Pta.03.03	Pta.98.04	Pta.06.03	Pta.99.02	P.luz.92.01	Pa.94.03	Pa.09.02	Pa.95.01	Mp.94.77.4	Papc.91.01	Papc.92.01	Papc.91.03	Papc.95.21	Ptp.95.02	Ptp.95.03
	Pois ( <i>Pisum ativum</i> )	40 50	40 33.33	80 73.33	46.66 3.33	0 20	33.33 20	93.33 86.66	80 60	100 70	100 86	86 60	60 26.66	79.33 3.33	40 40	86.66 93.33
Pois chiche ( <i>Cicer rietinum</i> )	0 0	20 20	0 0	26.66 33.33	30 50	0 0	6.66 20	0 0	20 13	0 0	66.66 40	40 53.33	86.66 80	66.66 46.66	40 13.33	0 40
Vesce ( <i>Vicia sativa</i> )	40 65.66	13.33 33.33	33.33 66.66	26.66 0	60 50	13.3 40	33.33 60	30 54	20 60	6.66 0	0 26.66	0 13.33	40 40	3.33 40	40 40	13.33 33.33
Luzerne ( <i>Medicago sativa</i> )	0 0	0 0	13.33 0	0 0	26 0	93.66 66.66	33.33 0	0 20	0 0	0 0	0 0	0 13.33	0 0	40 20	20 0	0 0
Bersim ( <i>Trifolium alexandrinum</i> )	90 73.33	73.33 80	13.33 63.33	40 30	70 53.33	0 0	26.66 13.33	0 0	20 40	0 0	0 0	0 0	6.66 6.66	6.66 10	60 20	26.66 0
Trèfle violet ( <i>Trifolium pratens</i> )	40 20	0 0	20 20	0 0	6.66 20	13.3 0	40 40	46 40	40 40	0 0	0 0	0 0	20 40	10 13.33	13.33 26.66	0 0

**Tableau 12 :** Pourcentage d'attaque de certains isolats testés sur quelques Fabacées

P.luz 92.01 isolé de luzerne s'est distingué par le plus grand nombre de petites spores monocellulaires (100%) et a été classé individuellement dans les deux dendrogrammes obtenus. Berthier (1997), Blossier (1997), ont rapporté l'absence de relation évidente entre la morphologie des conidies et la caractérisation moléculaire des espèces de *Phoma* et *Ascochyta*. Selon les travaux de Boumediene (2003), la RAPD a permis de classer les isolats en deux grands groupes à majorité monocellulaires rassemblant les *Phoma* et à majorité bicellulaires rassemblant les *Ascochyta* d'une part. D'autre part, les ramifications à l'intérieur du dendrogramme

rassemblent les isolats selon la plante hôte et non selon la taille des conidies, ce qui laisse penser que seule la septation est un caractère discriminant pour ces pathogènes. Ces résultats plus précis sont probablement dus à la technique de séparation sur gel d'Acrylamide et du coefficient de similarité utilisé (coefficient de Pearson).

Nous n'estimons donc que l'emploi d'autres outils moléculaires plus discriminants pour l'étude des relations phylogénétiques des espèces de *Phoma* et *Ascochyta* tels que les (Microsatellites et le séquençage) seraient nécessaires pour évaluer cette diversité.

### **3.5. Spécificité parasitaire des isolats de *Phoma* et *Ascochyta* à l'égard de quelques espèces de *Fabaceae***

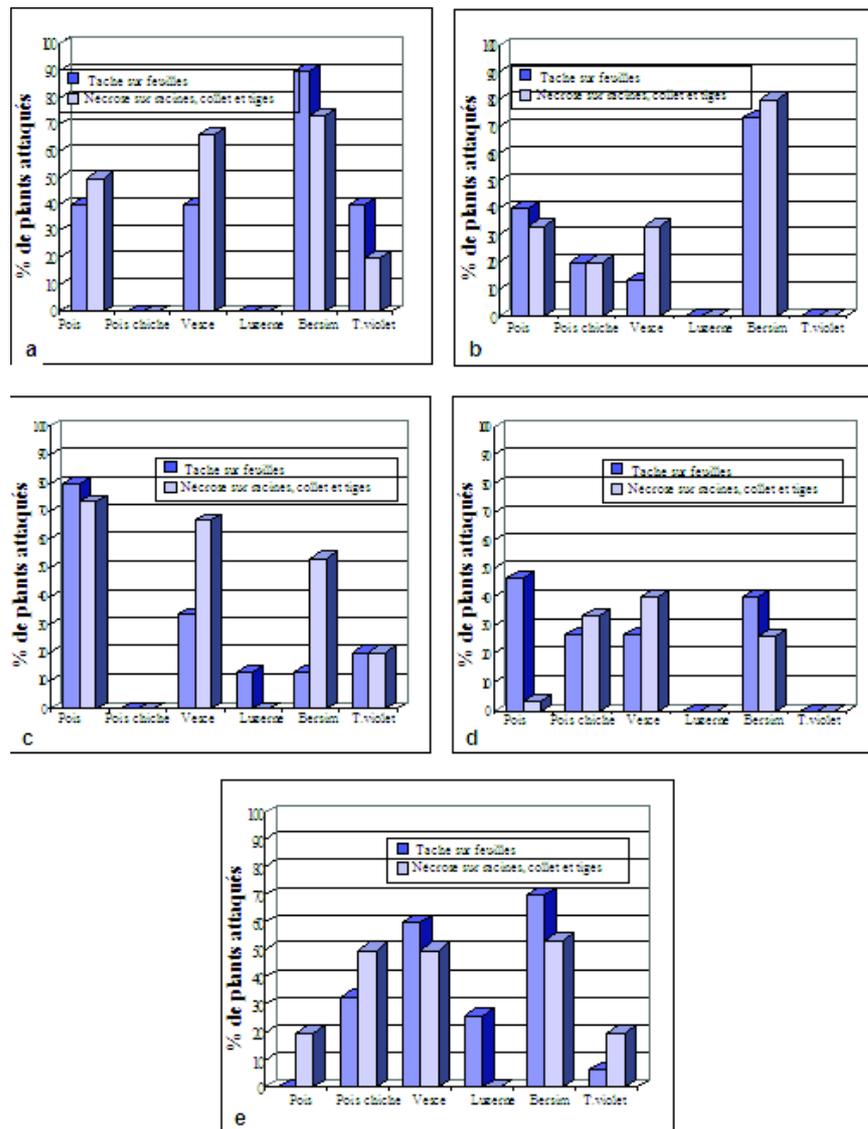
---

L'étude de la spécificité parasitaire a porté sur l'aptitude de 16 isolats de *Phoma* et d'*Ascochyta* d'attaquer différentes espèces de *Fabaceae* (pois chiche pois, luzerne, bersim, vesce et trèfle violet).

Les réponses obtenues après inoculation de semences pré germées et des plantules se sont traduites après 45 jours d'inoculation, par l'apparition de deux types de symptômes :

- Nécroses des racines, du collet et des tiges.
- Taches nécrotiques sur feuilles.

Deux notations sont considérées, la première correspond au pourcentage des plants présentant des symptômes au niveau des feuilles, après inoculation par pulvérisation. La deuxième, correspond au pourcentage de plants présentant des



**Figure 14 :** Comportement des Fabaceae à l'égard des isolats de Bersim (*Trifolium alexandrinum*).

(a) : Ata.98.03,

(b) : Pta.03.03 ,

(c) : Pta.98.04,

(d) : Pta.06.03,

(e) : Pta.99.02

symptômes au niveau des racines, collets et tiges, après trempage des semences. L'analyse des résultats est présentée dans le tableau 12.

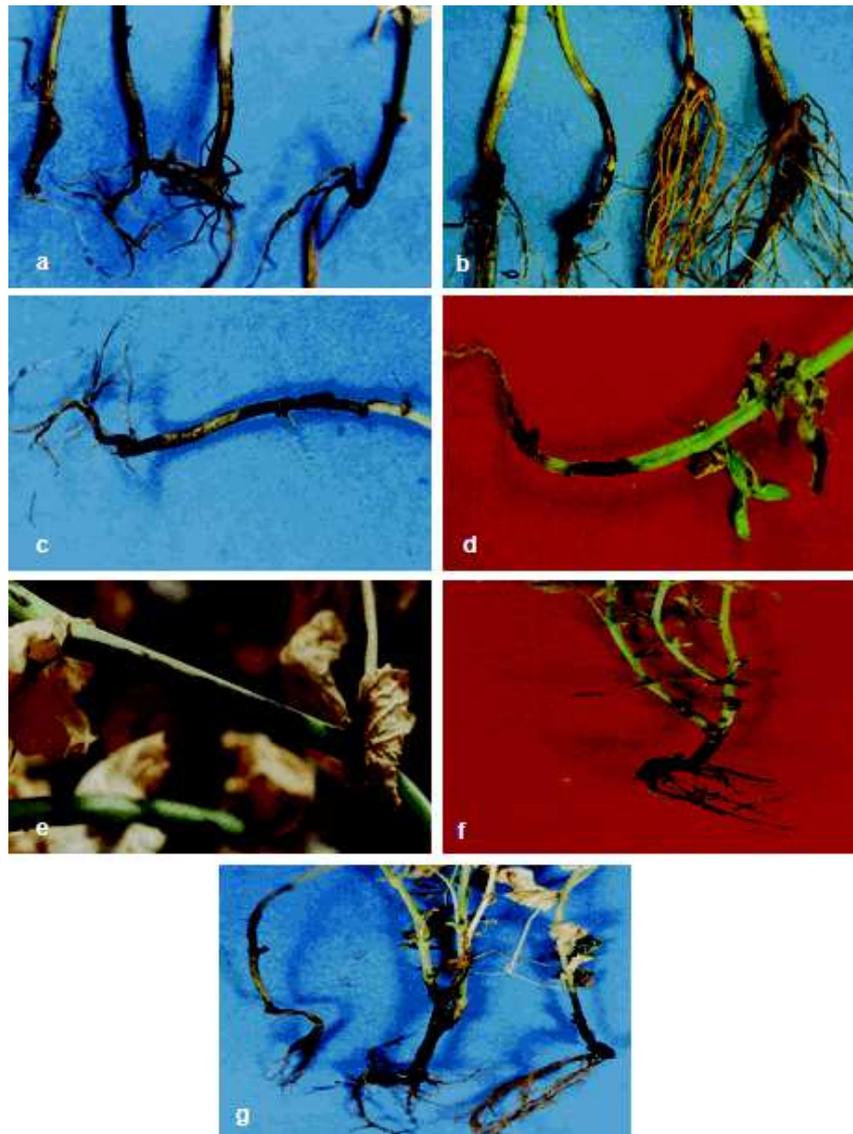
Les notations sont réalisées de sorte à mettre en évidence pour chaque groupe d'isolats obtenus d'une espèce de plante donnée, leur capacité à attaquer d'autres plantes de Fabacées.

### 3.5.1. Comportement des isolats de bersim

De tous les isolats de bersim étudiés, les deux isolats Ata. 98.03 et Pta. 03.03 se sont avérés les plus pathogènes sur leurs plantes hôtes (Fig. 14a, b), puisque 73,33% des plants présentent des nécroses sur racines, collets et tiges (Fig. 15a) et 90% présentent des nécroses sur feuilles après inoculation de l'isolat Ata. 98.03 (Fig. 17a). Ce dernier isolat provoque des symptômes très particuliers par rapport aux autres isolats testés, à savoir des macules claires bien délimitées par une marge brune, typique des symptômes de l'antracnose causés par le genre *Ascochyta*. Il a également induit 50% de nécroses sur racines, collets et tiges ainsi que 40% des taches sur feuilles de pois (Fig. 17b). L'isolat Pta. 03.03 a infecté surtout sa plante hôte le bersim avec 73,33 % des plants atteints au niveau du collet après inoculation des semences, et 80% des plants manifestent des nécroses sur feuilles (Fig. 17c) ; les symptômes sont totalement absents sur luzerne et trèfle violet.

L'isolat Pta. 98.04, s'est montré très pathogène sur pois (Fig. 14c) avec 80% des plants présentant des taches sur feuilles (Fig. 17d) et 73,33% présentant des nécroses de couleur marron violacée sur racines et surcollet, et atteignant toute la tige. Il attaque également la vesce, le bersim et le trèfle violet.

En revanche, Les 2 isolats Pta.06.03 et Pta.99.02 présentent une faible spécificité d'hôte (Fig. 14d, e). Sachant que, le premier isolat n'a pas pu infecter la luzerne et le trèfle violet. Par contre L'isolat Pta. 99.02 a attaqué la totalité des espèces avec un faible degré d'attaque ayant une préférence pour sa plante hôte le bersim, où 70% des plants présentent des taches sur feuilles (Fig. 17e) et 53,33% des nécroses sur racines, collets et tiges (Fig. 15b).



**Figure 15 :** Symptômes sur racines, collets et tiges de quelques Fabacées inoculées par certains isolats.

(a) : Symptômes sur racines et collet de vesce, trèfle violet, pois et de bersim, induits par l'isolat A.ta. 98.03.

(b) : Symptômes sur pois, vesce, bersim et pois chiche inoculés par l'isolat Pta. 99.02,

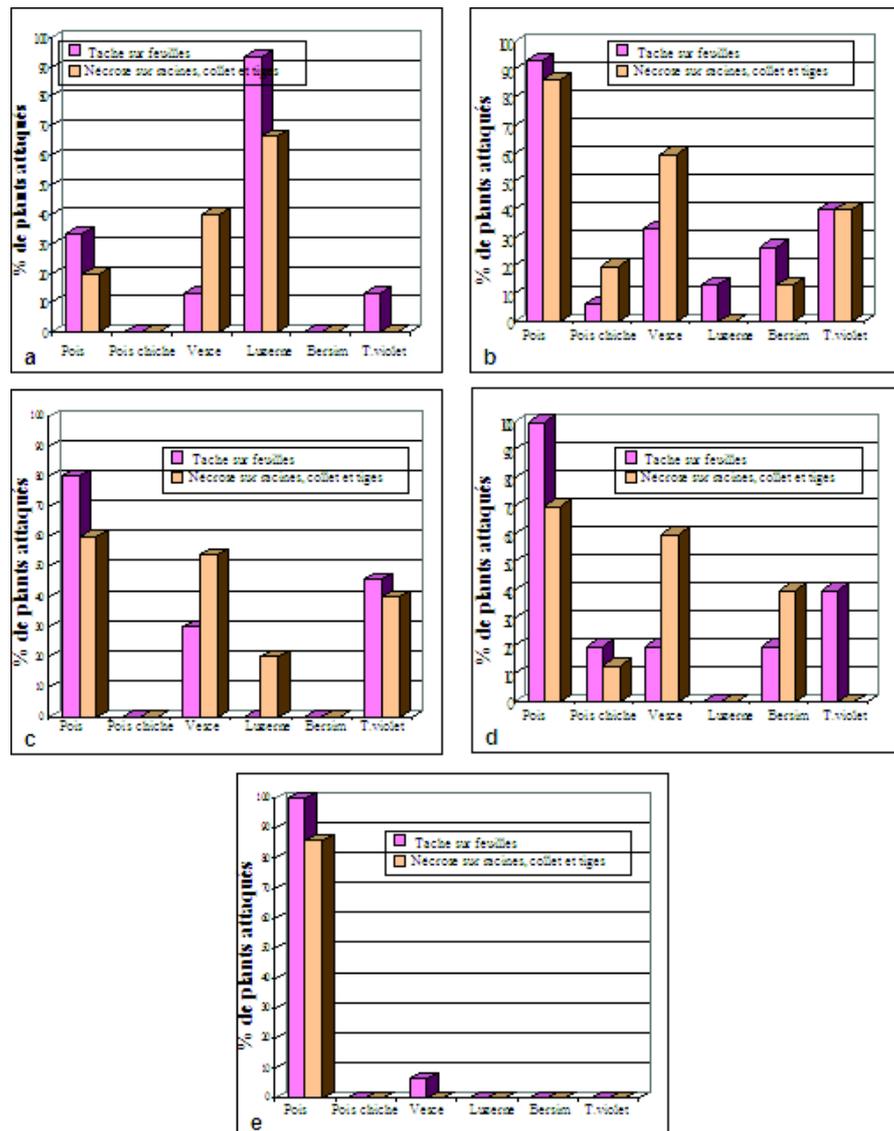
(c) : Nécrose sur le collet et la tige de luzerne, induite par l'isolat P.luz 92.01,

(d) : Symptômes induits par l'isolat Pa. 94.03,

(e) : Lésions nécrotiques entourant la tige de pois, provoquées par l'isolat Mp.94.77.4,

(f) : Nécrose du collet et des racines de pois chiche, causée par l'isolat Pa.Pc. 91.03,

(g) : Nécroses induites par l'isolat Pa.Pc. 95.21



**Figure 16 :** Comportement des Fabaceae à l'égard des isolats de luzerne (*Medicago sativa*) et de pois (*Pisum sativum*).

- (a) : P.Luz.92.01,
- (b) : Pa.94.03,
- (c) : Pa.09.02,
- (d) : Pa.95.01,
- (e) : Mp.94.77.4

### 3.5.2. Comportement des isolats de luzerne

Le seul isolat de luzerne (P.Luz.92.01) étudié dans ce travail, apparenté au *P. medicaginis*, s'est montré peu pathogène à l'égard du trèfle violet, de la vesce et du pois (Fig.16a), et sans aucune attaque sur le bersim et le pois chiche. Par contre nous avons noté que beaucoup de plants de luzerne, ont présenté des nécroses, 93,66% des plants présentent des taches de couleur marron violacée sur feuilles (Fig. 15c) et 66,66% présentent des nécroses sur

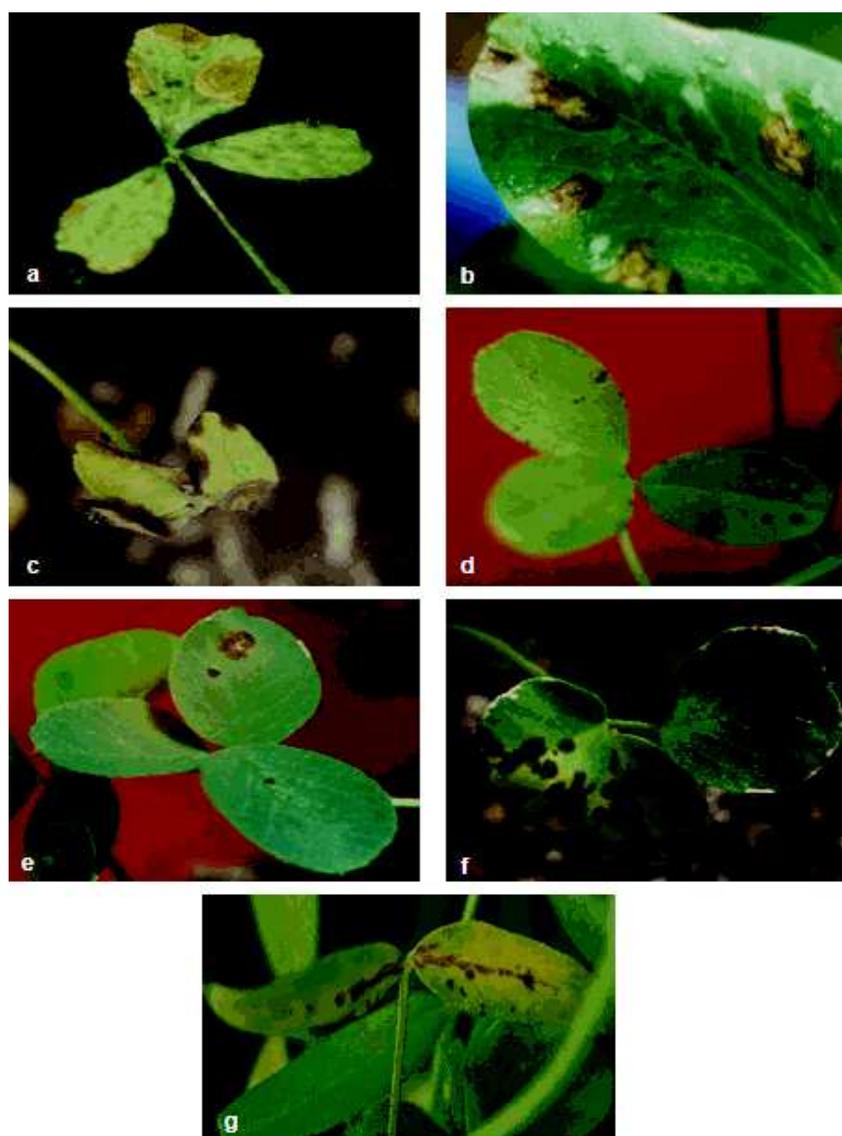
racines, collets et tiges (Fig. 17f). Cet isolat semble avoir une spécificité d'hôte limitée à la luzerne.

### 3.5.3. Comportement des isolats de pois

Ce groupe est composé de 3 isolats apparentés au *P. pinodella* (Pa 94.03, Pa 09.02, Pa 95.01) et un isolat Mp 94.77.4, considéré comme *M. pinodes* de référence. Tous ces isolats, ont attaqué les plants de pois avec une sévérité très marquée (Fig. 16 b, c, d, e).

En particulier l'isolat Pa.94.03, considéré comme un *P. pinodella* de référence, a fortement attaqué le pois avec 93,33% des plants présentant sur les feuilles, des taches nécrotiques diffuses de couleur foncée, et 86,66% des nécroses sur racines, collets et tiges (Fig.15d), alors que seulement 33,33% des plants de vesce sont infectés (fig. 17g). Pour l'isolat Pa.09.02, le pois est toujours la plante la plus attaquée avec 60% de plants infectés au niveau des racines et 80% présentent des taches au niveau des feuilles (Fig. 19a). En revanche, la vesce, le trèfle violet et le bersim présentent un degré d'attaque moindre qui varie d'un isolat à un autre et les symptômes observés sur pois chiche et luzerne restent faibles ou absents.

Enfin, l'isolat Mp. 94.77.4, apparenté au *M. pinodes* et dont le pois est l'hôte de ce pathogène est attaqué à 100%. Les plants présentent des taches nécrotiques au niveau des feuilles, qui apparaissent sous forme de petites taches brun-violacées puis s'élargissent et jaunissent aboutissant à la chute prématurée des feuilles (Fig. 19b) ; 86% des plants sont attaqués au niveau de la partie souterraine et les lésions sur la tige forment de larges stries qui fusionnent en entourant la tige (Fig. 15e).



**Figure 17 :** Taches nécrotiques induites par les isolats inoculés sur quelques Fabacées.

(a) : Lésions arrondies et bordées d'une marge brune foncée sur feuille de bersim induites par l'isolat A.ta. 98.03,

(b) : Nécrose sur feuilles de pois, induite par l'isolat A.ta. 98.03,

(c) : Taches nécrotiques sur folioles de bersim, induites par l'isolat P.ta. 03.03,

(d) : Taches sur folioles de bersim induites par l'isolat P.ta. 98.04, (e) : Nécrose sur feuilles de bersim, provoquées par l'isolat P.ta. 99.02,

(f) : Nécrose sur feuilles de luzerne inoculée par l'isolat P.luz. 92.01,

(g) : Symptômes sur feuilles de vesce induits par l'isolat Mp 94.77.4

#### 3.5.4. Comportement des isolats de pois chiche

Les quatre isolats de pois chiche étudiés, Papc. 91.01, Papc. 92.01, Papc. 93.01 et Papc.95.21, présentent un spectre d'hôte variable, mais le pois et le pois chiche restent les espèces les plus attaquées (Fig. 18a, b, c, d).

En effet, le pois s'est montré le plus sensible à l'isolat Papc.91.01, où 86% des plants sont atteints par des lésions au niveau des feuilles (Fig. 19c). Le pois chiche est un peu moins attaqué, avec seulement 66,66% des plants infectés au niveau des feuilles (Fig.19d). Pour l'isolat Papc.92.01, le pois et le pois chiche sont moyennement attaqués. Le reste des espèces telles que la luzerne, le bersim et le trèfle violet ne présentent aucun symptôme.

Par contre l'isolat Papc.93.01 a attaqué très fortement le pois chiche. En effet, 86,66% des plants présentent des taches sur feuilles (Fig. 19e) et 80% des plants présentent des nécroses sur racines (Fig. 15f).

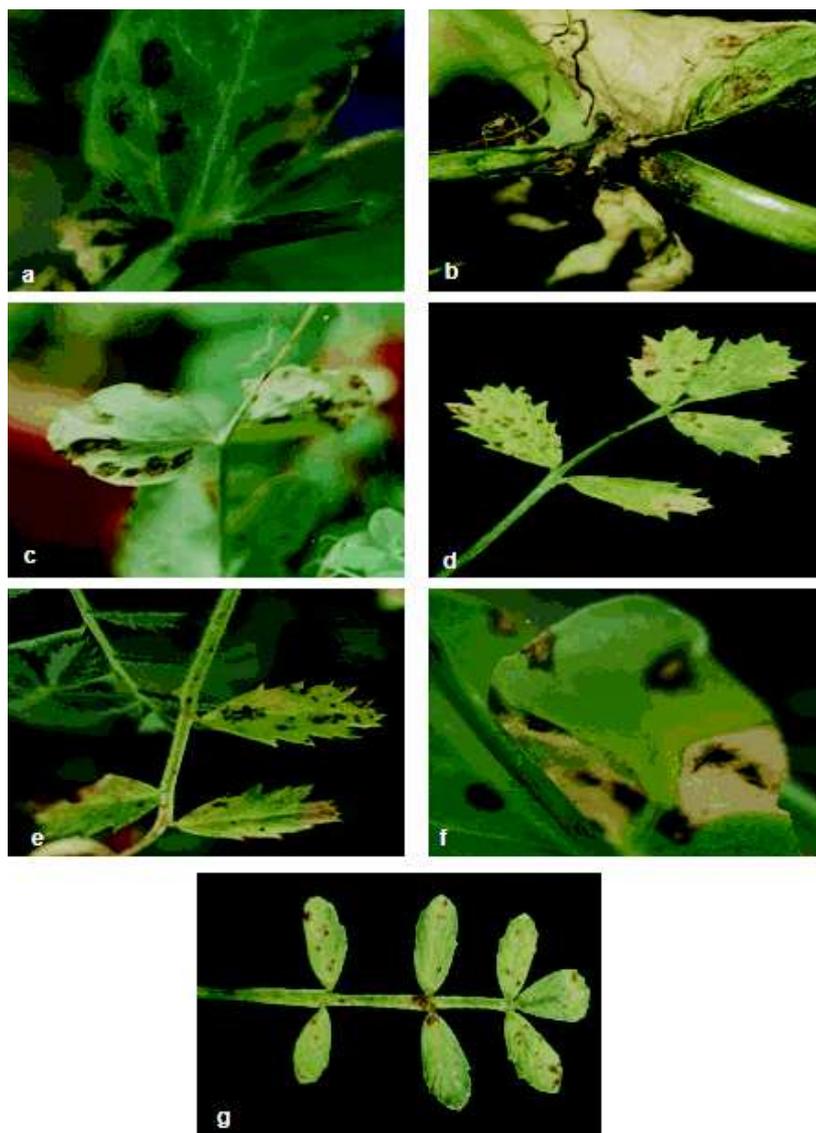
Enfin, une faible spécificité est notée chez l'isolat Papc.95.21, puisque la totalité des espèces de Fabacées testées sont attaquées avec un degré d'agressivité variable. Ainsi, 40% des plants de pois présentent des taches sur feuilles (Fig. 19f) et des nécroses sur racines, collets et tiges (Fig. 15g), et 52% présentent des taches sur les folioles de pois chiche (Fig. 19g). La vesce, la luzerne, le bersim et le trèfle violet sont très faiblement attaqués.

### **3.5.5. Comportement des isolats de trèfle violet**

Les deux isolats étudiés, à savoir le Ptp 95.02 et le Ptp 95.03 ont attaqué la quasi-totalité des plants inoculés (pois, pois chiche, vesce, luzerne, bersim et trèfle violet) et plus sévèrement le pois (Fig.18e, f). La luzerne et le trèfle violet non pas été infecté par l'isolat Ptp.95.03.

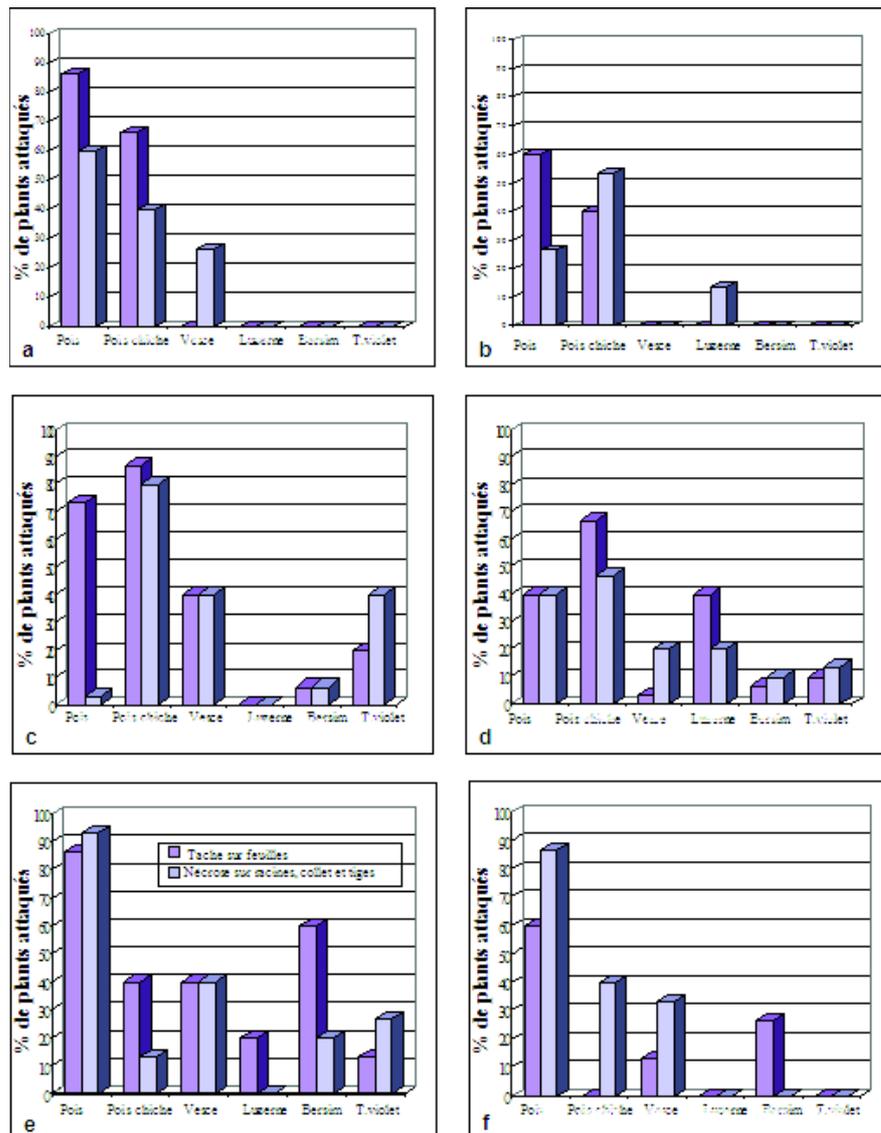
### **3.5.6. Discussion**

Le comportement des principaux isolats étudiés à l'égard des principales *Fabaceae* testées, nous a permis d'évaluer leur capacité d'attaquer cette gamme de plantes et de préciser la spécificité parasitaire de chacun d'eux.



**Figure 19** : Nécroses sur feuilles de Fabacées inoculées par quelques isolats.

- (a) : Taches nécrotiques diffuses sur pois, induites par l'isolat Pa.09. 02,
- (b) : symptômes sur feuilles de pois inoculé par l'isolat Mp 94.77.4,
- (c) : Taches nécrotiques sur pois, provoquées par l'isolat Papc 91.01,
- (d) : Petites taches brunes sur folioles de pois chiche, induites par l'isolat Pa.Pc. 91.01,
- (e) : Lésions sur folioles de pois chiche, induites par l'isolat Pa.Pc. 91.03,
- (f) : Taches arrondies sur feuilles de pois, induites par l'isolat Pa.Pc. 95.01,
- (g) : Aspect des macules sur pois chiche, induites par l'isolat Pa.Pc. 95.21



**Figure 18 :** Comportement des *Fabaceae* à l'égard des isolats de pois chiche (*Cicer arietinum*) et du trèfle violet (*Trifolium pratens*).

(a) : Isolat Papc.91.01,

(b) : Papc.92.01,

(c) : Papc.91.03,

(d) : Papc.95.21,

(e) : Ptp. 95.02,

(f) : Ptp.95.03

Les résultats obtenus montrent une attaque de toutes les espèces, avec des différences qui varient d'un isolat à un autre. En effet, certains isolats se sont montrés plus agressifs et plus spécifiques que d'autres vis-à-vis de cette gamme de *Fabaceae* étudiées.

Bien qu'ils soient issus de la même espèce végétale, les isolats de bersim ont présenté des spectres d'attaque différents selon la plante hôte. L'isolat A.ta 98.03 s'est distingué

du reste par le type de symptômes qu'il provoque, telles que des taches nécrotiques, qui sont des macules claires bien délimitées par une marge distincte, comparables à celles des espèces d'*Ascochyta* sur les légumineuses. Ce type de taches, sur le trèfle d'Alexandrie et la vesce, nous confirme une fois de plus la possible présence d'un *Ascochyta* inféodé au bersim, déjà décrit par Ghiat (2001), et Boumediene & al (2009) lors de la caractérisation des espèces de *Phoma* inféodées au *Fabaceae* où un plus grand nombre de *Fabaceae* à été utilisé. Où encore l'hypothèse de l'appartenance de cet isolat à l'espèce *A.trifolii* déjà isolé de trèfle d'Alexandrie (Chorin, 1944).

L'isolat (Pluz.92.01) apparenté à *P. medicaginis*, s'est avéré assez spécifique, car il a provoqué des attaques sévères sur la luzerne et très faiblement sur le pois et la vesce. Cet isolat est beaucoup plus adapté à la luzerne et aux *Medicago* annuelles. Ce résultat confirme son appartenance à l'espèce *P.m. var. medicaginis*. En effet, Ellwood & al (2006), avaient suggéré que cette espèce a un spectre d'hôte restreint, limité à *M. sativa* et *M. truncatula*. Toutefois, Berthier (1997) a rapporté que *P.m.var.medicaginis* peut attaquer d'autres *Fabaceae* à parts les luzernes. Nos résultats confirment que cette espèce de *Phoma* n'inclut pas dans sa gamme d'hôte le trèfle d'Alexandrie (Ghiat, 2001), ni le pois chiche, comme l'a été montré par la présente étude.

Comme autre isolat très spécifique, l'isolat Mp.94.77.4 apparenté au *M. pinodes*, est très spécifique car il n'induit des symptômes caractéristiques d'*Ascochyta* que sur les parties aériennes du pois. Ce résultat confirme que l'espèce *M. pinodes* possède une forte agressivité vis-à-vis du pois, et ne compte aucune autre espèce dans sa gamme d'hôte d'une part et il confirme que les *Ascochyta* spp. attaquent généralement les parties aériennes, d'autre part. En revanche, les *Phoma* spp., peuvent s'installer au niveau de tous les organes d'une plante (Allard & al, 1993).

Notre étude montre également que, les isolats obtenus à partir des différentes espèces de *Fabaceae* peuvent présenter des spectres d'hôtes semblables. En effet, l'isolat Pta.98.04 isolé de bersim, et qui attaque surtout le pois, présente un comportement comparable à celui de l'isolat Pa.94.03, considéré comme un *P. pinodella* de référence, peu spécifique mais très agressif vis-à-vis du pois chiche et de la vesce. Ce résultat confirme que cette espèce est très polyphage comme déjà rapporté par plusieurs auteurs (Leath, 1992 ; Berthier, 1997 ; Belakroum & Sardi, 1998 ; Boerema & al, 2004 ; Boumediene & al, 2009 ; Sutton, 1980). Par ailleurs, les isolats de pois chiche (PaPc.92.01, PaPc.91.01) et ceux du trèfle violet (Ptp.95.02, Ptp.95.03) se rapprochent beaucoup de l'espèce *P. pinodella* qui est capable d'infecter en plus du pois, le pois chiche (Madhavi, 2000) et le *Trifolium pratense* (Boerema & al, 1993).

Cette étude a également montré, que certains isolats présentent une faible spécificité parasitaire. Ceux isolés du bersim (Pta.03.03, Pta.06.03 et Pta.99.02), ont attaqué presque la totalité des espèces de *Fabaceae* avec toute fois une préférence à leur plante hôte, le bersim ; ils sont considérés de ce fait comme très polyphages. Cela confirme leur appartenance probable à une autre espèce de *Phoma* très polyphage, sur les *Fabaceae* fourragères. Cette hypothèse déjà émise par Boumediéne (2003), et a été avancée dans nos résultats (Ghiat, 2001), là où il a été suggéré l'existence d'espèces ou de variétés spécifiques à la vesce ou au trèfle d'Alexandrie, non encore décrites dans la littérature. Il en est de même, pour les deux isolats de pois chiche (PaPc.91.03 et PaPc.95.21) ayant une faible spécificité parasitaire, et dont l'établissement de leur gamme d'hôte s'avère difficile.

En effet, si pour les espèces d'*Ascochyta* inféodées aux *Fabaceae* à grosses graines, la notion de spécificité parasitaire ne se pose pas, en revanche nos résultats montrent une diversité de comportement des isolats de *Phoma* spp. sur les *Fabaceae* fourragères en

particulier. Ce résultat, rejoint les avis rapportés dans la littérature sur la difficulté d'étudier les isolats de *Phoma* des *Fabaceae*, en se basant uniquement sur leur gammes d'hôtes (Irinzi & al., 2009).

La confrontation des résultats de la spécificité parasitaire avec ceux de la RAPD, a permis de confirmer certaines hypothèses. Il a été démontré que le comportement parasitaire des isolats de *P. pinodella*, à savoir les *Phoma* de pois (Pa 94.03, Pa 95.01, Pa 95.21), ceux du trèfle violet (Ptp. 95.03, Ptp. 95.02) et celui du bersim (Pta. 98.04) est très différent de l'isolat P. Luz. 92.01, correspondant à un *P. m.var.medicaginis* et qui attaque la luzerne avec un grand pourcentage de plants.

## Conclusion générale

De par le monde, les *Fabaceae* continuent à subir des dégâts importants, par des attaques d'espèces appartenant au genre *Phoma*. La caractérisation de ces pathogènes est délicate à cause de leurs caractéristiques morphologiques très proches, et leur spécificité parasitaire mal établie. Cette étude constitue une contribution à l'étude de la diversité génétique de quelques isolats de *Phoma* spp. isolés de différentes *Fabaceae* alimentaires et fourragères. Par ailleurs, elle contribue également à l'identification de l'agent causal des dégâts occasionnés sur le trèfle d'Alexandrie depuis quelques années.

La caractérisation morphologique des isolats étudiés a montré une importante variabilité de la taille des conidies. Cependant, les résultats obtenus ont montré que les critères morphologiques tels que la taille et le nombre de septation des conidies ne sont pas tout à fait discriminants. Ainsi, les isolats ont été regroupés indépendamment de l'espèce hôte ou de l'origine géographique. Nous avons conclu par contre, que les isolats de *P. pinodella* possèdent généralement un pourcentage de conidies bicellulaires plus important que ceux de *P.m. var. medicaginis*, et les conidies septées de *P. pinodella* sont souvent de taille plus grande. D'autres isolats ont présenté des intervalles de taille variable, ce qui a rendu leur regroupement difficile à établir. Cette variabilité des critères morphologiques complique la distinction entre les espèces de *Phoma* spp. et certains isolats appartenant au genre *Ascochyta* qui leur sont proches.

L'étude de la compatibilité végétative a montré ses limites dans l'étude des isolats de *Phoma* spp. et *Ascochyta* spp. Toutefois, deux groupes sont mis en évidence ; le premier rassemblant les isolats de *M. pinodes* (Mp1, Mp 07.03, Mp 94.14.7), et le deuxième regroupant les isolats de *Phoma* (Pta 03.03, Ptp 95.02). Il reste que ces résultats ne nous ont pas fourni d'informations concernant la structuration des espèces de *Phoma* spp. ou *Ascochyta* spp. Il serait donc, intéressant de reprendre cette étude génétique sur une collection plus importante, tout en prenant en considération les limites apparues lors de cette étude.

L'étude du polymorphisme génétique par la RAPD a permis de mettre en évidence une variabilité inter et intra spécifique très importante des isolats étudiés. Il est possible de différencier les isolats de *P. pinodella* de ceux de *M. pinodes* d'une part, et les isolats de *P. pinodella* de ceux de *P. m. var. medicaginis* d'autre part. Cette étude confirme donc la grande diversité des espèces de *Phoma* inféodées aux *Fabaceae*, et également, la difficulté de caractériser certains isolats pathogènes sur les *Fabaceae* fourragères. En effet, certains isolats de *Phoma* de bersim n'ont pas été caractérisés, il faudra donc, rechercher des marqueurs moléculaires plus précis permettant de caractériser les isolats au sein de chaque espèce, et d'évaluer de manière plus précise la variabilité intra spécifique.

Les résultats de la spécificité d'hôte montrent que parmi les isolats à spores majoritairement monocellulaires, certains présentent le spectre d'hôte de *P. pinodella* (Pta.98.04, Pa.94.03, Pa.95.01, Pa.95.21, Pa.94.71.1, Pa.10.03, Ptp.95.02, Ptp.95.03, Papc. 92.01, Papc.91.01, Papc. 91.03). D'autres isolats P.Luz.92.01 celui de *P. m. var. medicaginis*, et deux isolats Pta.06.03, Pta.99.02 ce sont montrés très polyphage et ont cependant attaqué sévèrement le bersim et la vesce. Ce qui laisse penser à la présence d'autres espèces de *Phoma* non encore décrite.

Indépendamment de ces difficultés d'identification, cette étude nous a permis de rassembler des données importantes concernant la caractérisation par les méthodes traditionnelles et la diversité génétique des isolats de *Phoma* et *Ascochyta* étudiés. Cependant, ces connaissances acquises restent insuffisantes, et méritent d'être approfondies pour une meilleure caractérisation.

Enfin, la large gamme d'outils et de techniques moléculaires disponibles, devrait contribuer à améliorer la connaissance de la diversité et la biologie de ces champignons. Par ailleurs, comme déjà cité par d'autres travaux relatifs à cette étude une analyse génomique est à envisager pour vérifier l'existence au sein du genre *Phoma* d'autres espèces non encore décrites.

## Références bibliographiques

- Abdelguerfi, A. & Laouer, M. 2003.** Situation et possibilités de développement des productions fourragères et pastorales en Algérie. Acte de l'atelier national sur la stratégie de développement des cultures fourragères en Algérie. ITGC. 10-12 juin 2001. 36-48.
- Abdelguerfi-Laouer, M. 2005.** Diversité Eco génétique chez les Fabacées et leurs symbiotes : Cas de la section des *Intertextae* du genre *Medicago* L. *These*. Doctorat INA El Harrach (Alger). 186p.
- Abouzeid M A. & El-Tarabily, K. A. 2003.** Production of phytotoxins by *Ascochyta pisi* Lib., the causal agent of leaf spot disease of pea. *Int. J. Agri. Biol.* **5** .(2): 145-149.
- Allard, C., Bill, L. & Tauraud, G. 1993.** L'antracnose du pois. Revue bibliographique et synthèse. *Agronomie.* **13** : 5-24.
- Amroune, R., Khalfoun, A., Bellah, F. & Omar, L. 2007.** Résultats d'enquête sur les circuits formel et informel de commercialisation des semences fourragères en Algérie. *Céréaliculture ITGC.* **48** : 30- 38.
- Angevain, M. 1983.** Méthodes d'infection artificielle pour la sélection artificielle de la luzerne à *Phoma medicaginis*. *Agronomie.* **3** : 911-916.
- Angevain, M. 1989.** Les tiges noires de la luzerne. In : Raynal, G. Gonfran, J. Bournoville, R. & Courtillot, M, eds. Ennemis et maladies des prairies, 98-100.
- Aveskamp, M.M., De Gruyter, J. & Crous, P.W. 2008.** Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. *Fungal Diversity.* **31**: 1-18.
- Belabid, L. 2001.** La fusariose vasculaire de la lentille (*lens culinaris* med.) dans le nord-ouest algérien : morphologie et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* (schlecht.) Emend.S. H. f.sp. *lentis* (vasud. Srini) en relation avec la répartition géographique et le pouvoir pathogène. Thèse. Doctorat d'état. Université d'Oran. Es-sénia. 178 p.
- Belabid, L., Fortas, Z., Dalli, D., Khiare, M.A. & Amdjad, D. 2000.** Importance du flétrissement et de la pourriture racinaire de la lentille dans le Nord Ouest Algérien. *Cahiers Agricultures.* **9** (6) : 515-518.
- Belakroum, N., Sardi, K. 1998.** Contribution à l'étude des *Phoma* sp pathogènes des Fabacées fourragères : Caractérisation morphologique, cultural et spécificité d'hôte. Essai de résistance d'Ecotypes locaux de Medics à *Phoma medicaginis* Malbr & Roum. *Th. Ing* . INA. EL HARRACH. 80p.
- Bertier, C. 1997.** Caractérisation morphologique, moléculaire et étude de la spécificité d'hôte des principales espèces de *Phoma*, pathogènes des Fabacées (légumineuses). Mémoire de Maîtrise. Université d'Angers. 52p.
- Blossier, M. 1997.** Inventaire des maladies de la vesce et caractérisation des espèces de *Phoma* et d'*Ascochyta* des Fabacées. DESS Technologie du végétal. Université d'Angers. 54p.

- Boerema, G.H. 1976.** The *Phoma* species studied in culture by Dr. RWG, Dennis. Trans. *Brit. Mycol. Soc.* **67**: 289-319.
- Boerema, G.H. 1997.** Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes)-V Subdivision of the genus in sections. *Mycotaxon* LXIV, 321-333.
- Boerema, G.H., Pieters, R. & Hamers, M.E.C. 1993.** Check-list for scientific names of common parasitic fungi supplement Serie 2c,d (additions and corrections): Fungi on fieldcrops: pulse (legumes), forage crops (herbage legumes), vegetables and cruciferous crops. *Neth. J. Pl. Path.* **99** : 1-32.
- Boerema, G.H., De Gruyter, J., Noordeloos, M.E. & Hamers, M.E.C. 2004.** *Phoma* identification manual. Differentiation of specific and infraspecific taxa in culture. CABI Publishing, United Kingdom. 470p.
- Boillon, N. & Roux, M. 1996.** Utilisation de la luzerne par la vache laitière à haute production. *Cahiers Agricultures.* **5** : 137-148.
- Bonde, A & Trassova. 1913.** *Ascochyta Trifolii*. Journal "Bolestni Rasteni", VII(1913) p.205. In Saccardo, P.A. Sylloge Fungorum XXV: 332 (1913).
- Boumediene, N. 2003.** A study of *Phoma* spp. Pathogenic on fodder *Fabaceae* : Morphological characterisation, isoenzymatic and molecular analysis host specificity. Ln: Bayaa, B., Makkouk, K.M., Kumari, S.G., El- Ghariani. L., eds. Eighth Arab Congress of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Omar Al-Mukhtar University, El-Baida, Libya, 12-16 Octobre, 2003. 149 pages. Arab Society for plant protection, Beirut, Lebanon.
- Boumediene, N. & Bouznad, Z. 2006.** An investigation on susceptibility of ten local genotypes of annual alfalfa to spring black stem disease caused by *Phoma medicaginis* var *medicaginis*. Kumari, S.G., Makkouk, K.M., Al-Chaabi, S., El-Ahmed, A., eds. Ninth Arab Congress of Plant Protection, Congress Palace. Damascus, Syria, 19-23 Novembre. 251 pages. Arab Society for Plant Protection, Beirut, Lebanon.
- Boumediene, N., Ghat, N., Bouznad, Z. 2009.** Host specificity of *Phoma* spp. Pathogenic to fodder *Fabaceae*. In: Kumari, S. et al. (eds.) Abstracts Book of the 10th Arab Congress of Plant Protection. 10<sup>th</sup> Arab Congress of Plant Protection, 26-30 Oct. 2009, Crowne Plaza Hotel, Beirut, Lebanon. P. E67.
- Bouznad, Z. 1989.** Contribution à la connaissance du genre *Ascochyta*. Cas particulier de l'étude biologique, ultrastructurale et cytochimique des relations hôte-parasite chez le couple *Pisum sativum* L. *Ascochyta pisi* Lib. These. Doctorat d'Etat. Université Pierre et Marie Curie, Paris 6. 217p.
- Bouznad, Z. & Corbiere, R. 1998.** Application of molecular methods for characterization of *Phoma* and *Ascochyta* species of legumes. 3<sup>rd</sup> European conference on grain legumes. Valladolid. 94-95 ; 14-19 novembre.
- Bouznad, Z., Corbiere, R., Elbiari, A. & Spire, D. 1995.** Identification of *Ascochyta* species of legumes by Random Amplified Polymorphic DNA. Page 78. (in:) Second European Conference of Grain Legumes AEP, Copenhagen, Denmark.
- Bouznad, Z., Corbière, R., Devaux, M. & El-Biari, A. 1996.** Caractérisation par RAPD des espèces d'*Ascochyta* et de *Phoma* des légumineuses en Algérie. In : Ezzahiri B.

- Lyamani A. Farih A. & El-Yamani M, eds. Symposium régional sur les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires. Rabat. Maroc. 113-119.
- Bouznad, Z., Corbière, 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. In : Tivoli B. & Caubel G. eds. Les légumineuses alimentaires méditerranéennes. Actes du séminaire Gram (Groupe de Recherche Agronomique Méditerranéens des légumineuses alimentaires), INRA, Rennes, France. Les colloques **88**, 102-127.
- Bowen, J.K., Lewis, B.G & Matthews, P. 1997.** Discovery of the teleomorph of *Phoma medicaginis* var *pinodella* in culture. *Mycol. Res.* **101** (1): 80-84.
- Bretag, T.W. & Ramsey, M., 2001.** Foliar diseases caused by fungi *Ascochyta* spp. In: Kraft, J.M.,Pfleger, F.L. (Eds.), Compendium of *Pea* Diseases and Pests. 2nd ed. APS Press. *The American Phytopathological Society*, St. Paul, MN, USA, pp. 24–28.
- Bridge, P., Couteaudier, Y. & Clarkson, J. 1998.** Molecular variability of fungal pathogens. Edited by CAB International Wallingford Oxon OX10 8DE UK :187-207.
- Burdon, J.J. 1993.** The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Ann. Rev. Phytopathology.* 31: 305-323.
- Castell-Miller, C. V., Szabo, L., J., Gale, L., R., O'Neill, N., R. & samac, D. A. 2008.** Molecular variability of a Minnesota population of *Phoma. Medicaginis* var. *medicaginis*, the causal agent of spring black stem and leaf spot of alfalfa. *Can. J. Plant. Pathol.* **30** : 85-96.
- Chaabena, A., Abdfelguerfi, A. & Baameur, M., 2004.** Comportement et caractérisation de quelques variétés de luzerne (*Medicago sativa* L.). *Agriculture.* **3** : 271- 276
- Chilvers, M., I., Rogers, J., D, Dugan., F., M., Tewart, J., E., Chen, T. & Peever, L. 2009.** *Didymella pisi* sp. nov., the teleomorph of *Ascochyta pisi*. *Mycol. Res.* **113**: 391 – 400
- Chorin, M. 1944.** Leaf and stem spot of Egyptian clover. Palestine Jour. Bot, 4 N°2, R Ser., 175-178. illus1. In Experiment Station Record, Volume 94, Junaury- Jaune. 1946. p 69. 975pp.
- Correll, J. C., Klittich, C. J. R. & Leslie, J. F. 1987.** Nitrate non utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology.* **77** : 1640-1646
- Cove, D.J. 1976.** Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterisation of chlorate resistant mutants. *Heredity.* **36** : 191-203.
- Davidson, JA., Hartley, D., Priest, M., Krysinska-Kaczmarek, M., Herdina McKay, A. & Scott, ES. 2009.** A new species of *Phoma* causes *Ascochyta* blight symptoms on field peas (*Pisum sativum*) in South Australia. *Mycologia,* **101** (1): 120-128
- De Gruyter, J., Aveskamp, M.M., Woudenberg, J.H.C., Verkely, G. J.M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. w. 2009.** Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: Towards a reclassification of the *Phoma* complex. *Mycological Research.* **113**: 508-519.

- Dickman, M., B. 2000.** *Colletotrichum*. In JW Kronstad, ed. Fungal pathology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 127-148. 393pp.
- Dumas, B., Boudart, G, Centis, S. & Esquerrè-Tugayè, MT. 2000.** The endopolygalacturonase of *Colletotrichum lindeuthianum*: molecular characterisation, gene expression, and elicitor activity. In: S. Freeman, D. Prusky & MB. Dickman, eds. Host specificity, pathology and host pathogen interaction of *Colletotrichum*. APS Press, pp. 157-170
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., & Delen, N. 2007.** *Botrytis*: Biology, Pathology and Control. A C.I.P. Catalogue record for this book is available from the Library of Congress. Published by Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands. 403pp.
- FAO. 2007.** <http://www.fao.org/corp/statistics/fr/>
- Faris-Mokaiesh, S. 1995.** Caractérisation sérologique, biochimique et moléculaire d'*Ascochyta pisi*, *Mycosphaerella pinodes* et *Phoma medicaginis* var. *pinodella*, agents pathogènes du pois. These. Doctorat. Université Paris VI. 217p.
- Fatehi, J., Bridge, P.D. & Punithalingam, E. 2003.** Molecular relatedness within the "*Ascochyta pinodes*-complex". *Mycopathologia*. **156** : 317- 327.
- Furgal-Wegrzycka, H. & Wegrzycki, M. 2009.** Genotypic population structure of *Ascochyta pinodes* and *Phoma pinodella* in Poland. *Plant Breeding and Seed Science*. **59**. 21-51.
- Gaurilcikiene, I., Janususkaitė, D., Cesnuleviciene, R. & Ramanauskiene, J. 2008.** The suppression of stem base and root rot diseases of pea as affected by fungicidal seed treatment. *Zemdirbyste-Agriculture*. **95** (3): 50-57
- Gennari, S. & d'Ercole N., 1994.** Determination of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis* isolates. *Phytopathol. Mediterr.* **33**: 63-70.
- Gepts, P., Beavis, W.D., Brummer, E.C., Shoemaker, R.C., Stalker, H.T., Weeden, N.F. & Young, N.D. 2005.** Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant Physiol.* **137**:1228-1235
- Ghiat, N. 2001.** Caractérisation morphologique, culturale et spécificité parasitaire des *Phoma* spp. pathogènes des Fabacées fourragères. Identification de l'agent inféodé au bersim (*Trifolium alexandrium* L.). Mémoire Ing. INA. El Harrach. 38p.
- Ghiat N., N. Boumedienne et Z. Bouznad. 2009.** Identification of *Ascochyta* and *Phoma* species on clover : Comparison with other species from *Fabaceae*. Second Workshop on *Ascochyta*, 28- 2 juillet, Pulman, Washington State University, USA
- Gossen, B. D., Sheard, J.W., Beauchamp, C.J. & Morrall, R.A.A. 1986.** *Ascochyta lentis* renamed *Ascochyta fabae* f.sp. *Lentis*., Can. J. Plant Pathol. **8**: 154-160.
- Graham, P.H. & Vance, C.P. 2003.** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* **131**: 872-877
- Gruyter, J. de . 2002.** Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) —IX. Section *Macrospora*. *Persoonia* **18**(1), 85–102.
- Guarro, J., Gené, J., Alberto, M. & Stchigel, M. 1999.** Development in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*. **12** (3) : 454-500

- Hamadache, A. 2003.** Les ressources fourragères actuelles en Algérie. Situation et possibilité d'amélioration. Acte de l'atelier national sur la stratégie de développement des cultures fourragères en Algérie. ITGC. 10-12 juin 2001. 18-19
- Hernandez-Bello, M. A., Chilvers, M. I., Akamatsu, H. & Peever, T. L. 2006.** Host Specificity of *Ascochyta* spp. Infecting legumes of the *Viciae* and *Ciceraceae* tribes and pathogenicity of an interspecific hybrid. *The American Phytopathological Society*. **96** (10) : 1148-1156
- Henni, J.E., fortas Z. & Geiger, J. P. 1998.** Etude de la compatibilité végétative chez des souches de *Fusarium oxysporum* isolées dans la région Ouest de l'Algérie. *Phytopathol. Mediterr.* **37**: 69-74.
- Index fungorum. 2007.** Index Fungorum [ online]. Available from <http://www.indexfungorum.org> 5accessed 9 Octobre 2007]
- Irinyi, L. 2009.** Conventional and molecular comparaison of the taxonomy of *Phoma-Like* species. Thesis of doctoral. *Phd. dissertation*. Debrecen. 32p.
- Irinyi, L., Kövics G. J. & Sándor Erzsébet . 2007.** Classification of *Phoma* species using new phylogenetic marker analele Universitatii din Oradea, Fascicula: Protec#ia Mediului, vol. XII. 63- 69
- Irinyi, L., Kövics, G.J. & Sándor, E. 2009 a.** Taxonomical re-evaluation of *Phoma*-like soybean pathogenic fungi. *Mycol. Res.* **113**: 249- 260.
- Irinyi, L., Kövics, G.J., Sándor, E. & Rai, M., K. 2009 b.** Role of rDNA and protein-encoding genes in determining identity and phylogeny of fungi. *Journal of agricultural sciences*. Debrecen. 2009/38 supplement. 20-32.
- Kaiser, W. J. 1990.** Host range of the *Ascochyta* blight pathogen of chickpea. (Abstr.) *Phytopathology*. **80**: 889-890.
- Kaiser, W. J., Hannan, R. M. & Rogers, J. (L).D. 1994.** Factors affecting growth and sporulation of *Ascochyta fabae*. f. sp. *Lentis*. *Plant Dis.* **78**: 374-379.
- Kaiser, W.J., Wang, B-C. & Rogers, J.D. 1997.** *Ascochyta fabae* and *A. lentis*: host specificity, teleomorphs (*Didymella*), hybrid analysis, and taxonomic status. *Plant Dis.* **81**: 809–816.
- Kaiser, W.J. Viruega, J.R., Peever, T.L. & Trapero, A. 2008.** First report of *Ascochyta* blight outbreak of pea caused by *Ascochyta pisi* in Spain. *Plant Dis.* **92**: 13-65
- Kistler H.C. 1997.** Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*. **87**: 474–479.
- Kraft, J.M., & Pflieger, F.L. 2001,** Compendium of Pea Diseases and Pests. 2nd ed. APS Press. The American *Phytopathological Society*, St. Paul, MN, USA. 24–28. 110p.
- Labdi, P. 1991.** Perspectives de développement des légumineuses annuelles dans les systèmes céréaliers des zones semi-arides. *Céréaliculture ITGC.* **25**: 12-19
- Lawyer, A.S. 1990.** Diseases caused by *Ascochyta* spp. In: Hagedorn, D.J.Ed. Compendium of pea diseases. American phytopathological society. St Paul, MN. 11-15.

- Leath, K.T. 1992.** *Phoma*. In: singleton, L.L., Mihail, J.D. & Rush, C.M. eds. Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, 142-144
- Lee, S. B., & Taylor, J. W. 1990.** Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. Pp. 282-287 *in* M. A. INNIS, D. H. GELFAND, J. J. SNINSKY, and T. J. WHITE. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego. 482p.
- Leslie, J. F. 1993.** Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopathology*. **31**: 127-150.
- Leslie, J. F. & Summerell, B. A. 2006.** The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell publishing professional, State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA. 369 p.
- Madhavi, R. D, 2000.** *Phoma medicaginis*: A model pathosystem for *Medicago truncatula*. Master of Science (Biotechnology) Andhra University, Visakhapatnam, Andhra Pradesh, India. 81p.
- Mauries, M. & Paillat, Y. 1997.** Culture et utilisation de la luzerne : Pratiques des éleveurs de bovins du centre de la Charante. *Fourrages*. **149**: 69-79
- Monte, E., Bidge, P.D., & sutton, B.C. 1990.** Physiological and biochemical studies in Coelomycetes. *Phoma*. In: Gams, w., Seifert, K.A., Vander, As., Samson, R. A., eds. Developments in the Taxonomy of Anamorphic Fungi. Proceeding of the symposium “Taxonomy of Fungi imperfecti” Held at the fourth International Mycological Congress, Regensburg. *Studies in Mycology* 32, 21-28.
- Newton, A. C. 1987** . Markers in pathogen populations. In: Genetic and plant pathogenesis. Ed. by British Society for plant pathology, Blackwell scientific Publications, Oxford. London. Edinbergh. Boston. Palo. Alto. Melbourne, pp 187-194.
- Noordeloos, Me., De Gruyter, J., Vaneijk, G.W. & Roeijmans, H.J. 1993.** Production of dendritic crystals in pure cultures of *Phoma* and *Ascochyta* and its value as a taxonomic character relative to morphology and cultural characteristics. *Mycol. Res.* **97** (11): 1343 –1350
- O’Neill, N. R., Van Berkum, O., Lin, J.I., Kuo, J., Ude, G.N., Kenworthy, W. & Sounders, J.a. 1997.** Application of amplified restriction on fragment length polymorphism for genetic characterisation of *Colletotrichum* pathogens of Alfalfa. *Phytopathology*. **87**: 745-750.
- Onfroy, C., Tivoli, B., Corbière, R. & Bouznad, Z. 1999.** Cultural, molecular and pathogenic variability of *Mycosphaerella pinodes* and *Phoma medicaginis* var. *pinodella* isolates from dried pea (*Pisum sativum*) in France. *Plant Pathology*. **48**: 218-229.
- Onfroy, C., Baranger, A. & Tivoli, B. 2007.** Biotic factors affecting the expression of partial resistance in pea to *Ascochyta* blight in a detached stipule assay. *Eur. J. Plant Pathol.* **118**: 13–27
- Peever, T.L., Barve, M.P., Stone, L.J. & Kaiser, W.J. 2007.** Evolutionary relationships among *Ascochyta* species infecting wild and cultivated hosts in the legume tribes *Cicereae* and *Vicieae*. *Mycologia*. **99**: 59-77.

- Persson, S., Bodker, L. & Larsson-Wikstrom, M. 1997.** Prevalence and pathogenicity of foot and root in Southern Scandinavia. *Plant Dis.* **81**: 171-174.
- Puhalla, J.E. 1985.** Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* **63**: 179-183
- Rahal-bouziiane, H., Mossab, K., Hamdi, S. & Kharis, M. 2003.** Situation des fourrages cultivés dans la région d'Adrar. Recherche agronomique. INRAA. N°12. 37-49.
- Rahal-Bouziiane, H. 2005.** Caractéristiques agro-morphologiques et valeur nutritive de population locales de luzerne pérenne (*Medicago sativa* L.), originaires du Hoggar (Algérie). INRAA. Revue semestrielle. 16 juin 2005.
- Russelle M. 2001.** Alfalfa. *Am. Sci.* **89** : 252-259. <http://www.americanscientist.org/template/IssueTOC/issue/390>
- Salhi, N. 2004.** Etude de la diversité génétique d'une collection de *Botrytis cinerea* Pers. et de *Botrytis fabae* Sard., agents de la maladie taches chocolat sur fève. Mem. Magister, INA, El Harrach. 186pp
- 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.
- Setti, B. & Bouznad, Z. 1998.** *Fusarium* root rot and wilt of lentil in Western Algeria. In proc. Of the 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes. 14-19 Novembre. Valladolid, Spain. AEP (Eds). 254p
- Setti, B., Bencheikh, M., Henni, J.E., & Neema, C. 2011.** Advance of molecular markers application in plant pathology research. *European Journal of Scientific Research.* Vol.50. No.1: 110-123.
- Simpson, M.G. 2006.** Plant systematics. Elsevier Academic Press. 590p.
- Sutton, B.C. 1980.** The Coelomycetes Fungi imperfect with pycnidia, acervuli and stromata. 1<sup>st</sup> eds. Commonwealth Mycological Institute. U. K.
- Tadja, A., Benkada, M. Y., Rickauer, M., Bendahmane, B. S. & Benkhelifa, M. 2009.** Characterization of *Ascochyta* as pathological species of pea (*Pisum sativum*) at the North-West of Algeria. *J. Agronomy.* **8**: 100-106.
- Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J., & Oliveira, H. 2002.** Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology* **92**: 986-996.
- Tantaoui A. & Boisson C. 1991.** Compatibilité végétative d'isolats du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albidis* et *Fusarium oxysporum* de la rhizosphère du palmier dattier et des sols de palmeraies. *Phytopathol. Mediterr.* **30** : 155-163.
- Tivoli, B., Halila, H. & Porta-Puglia, A. 1997.** Les anthracnoses des légumineuses à grosses graines dans les pays du pourtour méditerranéen. Ed. INRA. Paris 1998 (Les colloques n° 88) : 81-101.
- Tivoli, B., Baranger, A., Sivasithamparam, K. & Barbetti, M.J. 2006.** Annual *Medicago*: From a model crop challenged by a spectrum of necrotrophic pathogens

to a model plant to explore the nature of disease resistance. *Ann Botany*. **98**: 1117–1128.

**Tivoli, B. & Banniza, S. 2007.** Comparative epidemiology of *Ascochyta* blights on grain legumes. *Eur. J. Plant Pathol.* **119** : 59–76.

**Von Arx, J.A. 1987.** Plant pathogenic Fungi. J. Gramer, Berlin.

**Weigand, F., Baum, M. & Udupa, S. 1993.** DNA Molecular Marker Techniques. Technical manual n° 20. ICARDA, Aleppo, Syria. 21 p.

**Zaghouane, O., Ardjout, N., Bouchata, K., Bouhouchine, L., Branki, N. & Seba, N. 2000.** La réhabilitation et le développement des légumineuses alimentaires dans le cadre du programme de reconversion. *Céréaliculture ITGC*. 34: 61- 66.

# ANNEXE

## Annexe 1

### Composition des milieux de culture

#### Milieu Mathur

Glucose 2,8g

Peptone 1,5g

Extrait de levure 0,5g

Mg<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1,23g

KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 2,72 g

Agar 15g

H<sub>2</sub>O q. s. p 1000ml

#### Milieu liquide pour la production du mycélium

Pomme de terre 200 g

Glucose 20 g

H<sub>2</sub>O q. s. p 1000 ml

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

**Milieu Mathur**

Glucose	2,8g
Peptone	1,5g
Extrait de levure	0,5g
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,23g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g
Agar	15g
H <sub>2</sub> O q. s. p.	1000ml

**Milieu liquide pour la production du mycélium**

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
H <sub>2</sub> O q. s. p.	1000 ml
Stérilisation à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C	

## Annexe 2

**Milieus de culture utilisés pour la compatibilité végétative****1- Milieu de base**

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

Saccharose 30 g

KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 1 g

KCl 0,5 g

MgSO<sub>4</sub> , 7H<sub>2</sub>O 0,5 g

Fe SO<sub>4</sub> , 7H<sub>2</sub>O 10 g

Agar 20 g

Solution d'oligo-éléments 0,2 ml

H<sub>2</sub>O q. s. p. 1000 ml

**2- Solution d'oligo-éléments**

Acide citrique 5 g  
Zn SO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 5 g  
Fe (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6H<sub>2</sub>O 1 g  
Cu SO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O 250 mg  
Fe SO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 4,75 g  
Mn SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 50 mg  
H<sub>3</sub> Bo<sub>3</sub> 50 mg  
Na<sub>2</sub> Mo O<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 50 mg  
H<sub>2</sub>O q. s. p. 100 ml

**3- Milieu Minimum (MM)**

Milieu de base 1000 ml  
Na NO<sub>3</sub> 2 g

**4- Milieu de sélection (MMC)**

Milieu de base 1000 ml  
L-Asparagine 1,6 g  
KClO<sub>3</sub> 15 g  
Na NO<sub>3</sub> 2 g

**5- Milieu nitrite**

Milieu de base 1000 ml  
Na NO<sub>2</sub> 0,5 g

**6- Milieu hypoxanthine**

Milieu de base 1000 ml  
Hypoxanthine 0,2 g

**7- Milieu de conservation**

Milieu de base 1000 ml  
L-Asparagine 1,6 g  
Na NO<sub>3</sub> 2 g

## Annexe 3

### Solution pour les analyses moléculaires (ADN)

· Solutions stock pour tampons

1. Tris HCL 1M, pH 7,2

---

Tris 12,11g

HCl 12N q.s.p. pH 7,2

H<sub>2</sub>O q.s.p 100ml

Ajuster le pH avant de compléter le volume à 100ml

1. EDTA 0,5 M pH8

EDTA di-sodique 18,6g

H<sub>2</sub>O q.s.p. 100ml

Ajuster à pH8 avec du Na OH 10M

1. SDS 10%

SDS 10g

H<sub>2</sub>O q.s.p. 100ml

Chauffer à 68°C

1. TAE 10X

Tris base 1 M pH 8,4, 84 g

Acide acétique glacial 1,14 ml

EDTA 0,5 M pH 8,2 ml

H<sub>2</sub>O stérilisée q. s. p100 ml

1. Tampons

**5-1-Tampon de lyse** : Tris HCl pH 7,2 50mM/ EDTA 50mM/ SDS 3%

Tris- HCl 1M 25ml

EDTA 0,5M 50ml

SDS 10% 150ml

2-mercaptoéthanol 5ml

H<sub>2</sub>O q.s.p 500ml

**5-2- Acétate de Sodium (NaOAc) pH 8 3M**

Acétate de sodium 57,81g

H<sub>2</sub>O q.s.p 100ml

**5-3- Ethanol 70%**, se conserve à -20°C

Ethanol 70ml

H<sub>2</sub>O q.s.p 100ml

**5-4- Isopropanol froid, se conserve à -20°C**

**5-5- Tampon T. E. x 1 (Tris-EDTA) Tris 10 mM, EDTA 1mM**

Tris base 1 M pH 8,2, 11 g

EDTA 0,5 M pH 8,0, 0,372 g

H<sub>2</sub>O stérilisée q. s. p. 100 ml

#### **5-6- Tampon de charge (loading buffer)**

Bleu de Bromophénol 0,25 g

Glycérol 30 ml

H<sub>2</sub>O stérilisée q. s. p 100 ml

#### **5-7- Solution Bromure d'ethidium**

Solution mère de BET (10mg/ml) 100µl

Eau 800ml

Laisser colorer pendant 4 heures.

## **Annexe 4**

### **4-1-Protocole d'extraction de l'ADN au SDS**

1. Broyer dans un tube eppendorf de 2ml, l'équivalent de Broyer 2 g de mycélium fongique dans l'azote liquide jusqu'à obtenir une poudre fine.
2. Ajouter 700µl de tampon de lyse chaud (65°) et homogénéiser le mélange
3. Mettre à incuber 1 heure à 65° (bain-marie) pour bien réhydrater et lyser le mycélium.
4. Ajouter un volume de Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique (25 :24 :1). Bien mélanger au vortex.
5. Centrifuger 15 minutes à 13 000 tours.
6. Transférer le surnageant dans un nouveau tube. Pipeter la phase aqueuse contenant l'ADN, en évitant de prélever l'interface.
7. Ajouter 10µl d'acétate de sodium 3M puis 0,54 volume d'isopropanol froid. Agiter doucement avec un agitateur pendant 20 min, L'ADN précipite et devient visible.
8. Centrifuger 6 min à 13 000 tours. pm, à 4°C.
9. Enlever le surnageant.
10. Rincer 3 fois à l'éthanol à 70% (500µl)
11. Centrifuger 5 minutes à 13 000 tours. pm, à 4°C. Vider le surnageant et laisser sécher le culot durant au moins 15 minutes.
12. Ajouter l'ARNases pour digérer les ARNs (10µl par 100µl d'échantillon).
13. Dissoudre l'ADN dans 50 µl de TE et conserver à 4°C.

### **4-2- Préparation de gel d'agarose**

1. préparer un gel d'agarose à 1%, soit 0,5 g d'agarose dans 50 ml de TAE x1.
2. Mettre à bouillir à 60° C, puis laisser refroidir.
3. Coller le ruban adhésif aux deux extrémités de la cuvette.
4. Préparer le support en plaçant les 2 peignes pour obtenir les différents puits dans la cuvette.
5. Couler le gel refroidi à 60° C tout en tenant le peigne.
6. Enlever les bulles d'air à l'aide d'une pipette pasteur.

7. 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.
8. Déposer 8µl d'échantillon par puits
9. Mettre a amplifié durant 1 heure. À 80 V.
10. Coloration du gel : mettre le gel dans une solution de BET pendant environ 2h.

## Annexe 5 :

Isolats	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
C13																											
B1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
B2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
B3	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B4	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
B5	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	
B6	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	
B7	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0
B8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	
B9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
B10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
B12	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B13	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Tableau : Matrice de la présence ou l'absence de bandes obtenus avec l'amorces C13

### Isolats :

- 1: Pa pc 91.01,
- 2: Pa 94.71.1,
- 3: Mp 08.03,
- 4: Mp 94.14.7,
- 5: Pta 03.03,
- 6: Pa 15.03,
- 7: Mp 94.77.4,
- 8: Mp 07.03,
- 9: Pa 10.03,
- 10: Pa 94.03,
- 11: Pa C8,
- 12: Mp1
- 13: Ptp 95.02,
- 14: Pa 95.21,
- 15: PLuz 92.01,
- 16: Pa 95.01,
- 17:., Papc 92.01
- 18: Pa 09.02,
- 19: Papc 95.21,

- **20:** Ata 98.03,
- **21:** Papc 91.03,
- **22:** Ptp 95.03,
- **23:** Pta 06.03,
- **24:** Pa 21.03,
- **25:** Pta 99.02,
- **26 :** Pta.98. 04

## Annexe 6 :

Isolats \ C18	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
B1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0
B2	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
B3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
B4	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1
B5	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0
B6	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
B7	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
B8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
B9	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
B10	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0

Tableau : Matrice de la présence ou l'absence de bandes obtenus avec l'amorces C18

### Isolats :

- **1:** Pa pc 91.01,
- **2:** Pa 94.71.1,
- **3:** Mp 08.03,
- **4:** Mp 94.14.7,
- **5:** Pta 03.03,
- **6:** Pa 15.03,
- **7:** Mp 94.77.4,
- **8:** Mp 07.03,
- **9:** Pa 10.03,
- **10:** Pa 94.03,
- **11:** Pa C8,
- **12:** Mp1,
- **13:** Ptp 95.02,
- **14:** Pa 95.21,
- **15:** PLuz 92.01,
- **16:** Pa 95.01,
- **17:**., Papc 92.01
- **18:** Pa 09.02,
- **19:** Papc 95.21

- 20: Ata 98.03,
- 21: Papc 91.03,
- 22: Ptp 95.03,
- 23: Pta 06.03,
- 24: Pa 21.03,
- 25: Pta 99.02,
- 26 : Pta.98. 04

## Annexe 7 :

Isolats	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26		
C13																												
B1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1		
B2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0		
B3	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
B4	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
B5	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	
B6	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	
B7	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	
B8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	
B9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
B10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
B12	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B13	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
B1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0
B2	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	
B3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
B4	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	
B5	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	
B6	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
B7	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
B8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
B9	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
B10	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	

Tableau : Matrice de la présence ou l'absence de bandes obtenus avec les deux amorces combinées C13 et C18

### Isolats :

- 1: Pa pc 91.01,
- 2: Pa 94.71.1,
- 3: Mp 08.03,
- 4: Mp 94.14.7,
- 5: Pta 03.03,
- 6: Pa 15.03,
- 7: Mp 94.77.4,
- 8: Mp 07.0
- 9: Pa 10.03,
- 10: Pa 94.03,
- 11: Pa C8,
- 12: Mp1,

- 13: Ptp 95.02,
- 14: Pa 95.21,
- 15: PLuz 92.01,
- 16: Pa 95.01,
- 17:., Papc 92.01
- 18: Pa 09.02,
- 19: Papc 95.21,
- 20: Ata 98.03,
- 21: Papc 91.03,
- 22: Ptp 95.03,
- 23: Pta 06.03
- 24: Pa 21.03,
- 25: Pta 99.02,
- 26 : Pta.98. 04

## Annexe 8 :

Isolats	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
C13																					
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
B3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
B4	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0
B6	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1
B7	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B8	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
B9	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B10	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
B11	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B12	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B13	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
B14	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
B15	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau : Matrice de la présence ou l'absence de bandes des isolats de *Phoma* spp avec les profils de quelques espèces

### Isolats :

- 1 : Ptp 95.03,
- 2 :Pta 98.04,
- 3 : Ata.98.03,
- 4 : Pta 06.03,
- 5 :Papc 91.03,
- 6 : Papc 95.21,
- 7 :Papc 92.01,
- 8 :Papc 91.01,
- 9 :Ptp 95.02,

- 
- **10** : Pta 99.02,
  - **11** : Pa 94.03,
  - **12** : Pa 95.01,
  - **13** : Pa 95.21,
  - **14** : Pta 03.03,
  - **15** : A lentis,
  - **16** : A fabae,
  - **17** : A viciae,
  - **18** : A rabiei,
  - **19** : A pisi,
  - **20** : Mp 94.77.4,
  - **21** : P.luz. 92.01