



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abd El Hamid Ibn Badis de Mostaganem
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département d'Agronomie



THÈSE

POUR L'OBTENTION DU GRADE
DE DOCTEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES

Option : Protection des végétaux

Présentée par :
Mr MAHIOUT Djamel

Thème

Contribution à la caractérisation de *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.,
agent causal de l'anthracnose du pois chiche (*Cicer arietinum* L.)
et étude de son interaction avec *Medicago truncatula* Gaertn.

Soutenue publiquement le : 03/07/2017

Devant le Jury :

M. LOTMANI Brahim	Pr. U. Mostaganem	Président
M. BENDAHMANE Boubekeur Seddik	Pr. U. Mostaganem	Directeur de thèse
M. YUCEF BENKADA Mokhtar	Pr. U. Mostaganem	Co-promoteur
Mme RICKAUER Martina	Pr. ENSA/INP, Toulouse, France	Examinatrice
M. BELABID Lakhdar	Pr. U. Mascara	Examineur
M. BEKADA Ahmed Mohammed Ali	Pr. C.U. Tissemsilt	Examineur

Année universitaire 2016 - 2017

On n'est jamais arrivé à aucune vérité sans s'être trompé au moins quatorze fois ou peut-être même cent quatorze et c'est peut-être un honneur en son genre.

Fiodor Dostoïevski

A ma chère mère **Baya**, à **Kenza**, à **Djida** et à **Lucas** qui ont patienté durant toutes ces années, car c'est grâce à une partie du temps que je devais leur consacrer, que ce travail a vu le jour. Je leur dis merci.

A mon Père **Abdelaziz**,

A Yemma Chacha,

A Nana Ouardia,

A Dda Smail

Djamel

REMERCIEMENTS

J'exprime ma sincère reconnaissance et toute mon amitié à tous ceux qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce travail.

Que le Professeur BENDAHMANE Boubekeur Seddik, mon directeur de thèse, trouve ici ma profonde reconnaissance et ma profonde estime pour avoir cru en ma détermination, pour sa profonde confiance et son attention durant la réalisation de mes travaux. Ses conseils et ses orientations sont gravés dans ma mémoire et guideront à jamais mes prochains pas dans la poursuite de ma carrière. Merci, encore merci, bien que ces mots ne sont pas là les mots appropriés.

Ma profonde gratitude va au Professeur YUCEF BENKADA Mokhtar, pour toute l'aide et les conseils qu'il m'a prodigués durant toute la période de réalisation de cette thèse. Pour avoir veillé au bon déroulement de mes stages au niveau de l'ENSA de Toulouse. Merci, également, merci, bien que ces mots aussi ne sont pas là appropriés pour exprimer toute ma reconnaissance et toute mon estime.

Ma profonde reconnaissance va au professeur RICKAUER Martina pour m'avoir accueilli dans son laboratoire SP2, puis ECOLAB à L'ENSA de Toulouse. Merci à elle de m'avoir initié aux techniques de biologie moléculaire, d'avoir dirigé le projet PHC Tassili 07 MDU 697, grâce auquel une partie de ce travail a été réalisée. Merci aussi d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements vont également à Messieurs les professeurs LOTMANI Brahim, pour avoir accepté de présider le jury et examiné ce travail, les Professeurs BELABID Lakhdar et BEKADA Ahmed Mohammed Ali, d'avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie de mon jury.

Merci aux responsables du projet PHC Tassili 07 MDU 697 et à toute l'équipe du laboratoire SP2 de Toulouse.

Merci au Docteur OUFFROUKH Ammar, de l'INRA de Constantine, pour ses conseils et pour son aide et ses encouragements.

Je remercie M. LAKEHAL Ayoub, technicien à l'ITGC de Sidi Bel Abbes, pour son aide précieuse durant la récolte des échantillons de pois chiche sur terrain.

Je remercie tout le personnel du laboratoire pédagogique de Phytopathologie de l'université de Mostaganem.

Je remercie le Professeur HALBOUCHE Miloud et le Docteur BENABDELMOUMEN Djilali pour leur aide précieuse dans les traitements statistiques. Je remercie mes ami(e)s et collègues enseignants, ABBOU Mohamed, SAIAH Farida, BOUALEM Malika et TIAIBA Ammar pour leur indéfectible soutien. Merci à mon cher ami DALI Mohamed.

Résumé

Seize isolats de *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab, champignon responsable de l'antracnose du pois chiche (*Cicer arietinum* L.), récoltés dans six régions du nord-ouest algérien montrent une variabilité culturelle, morphologique et pathogénique.

L'étude pathogénique a mis en évidence l'existence d'un pathotype III (très agressif) dans deux régions différentes.

L'étude moléculaire basée sur l'utilisation des amorces microsatellites, (M13), (ATC)₅, (GAA)₅, (TGTC)₄, n'a pas permis de déceler un quelconque polymorphisme, en revanche, les amorces MAT ont révélé l'existence de deux mating type (MAT1-1 et MAT1-2) dans la plupart des régions.

L'inoculation de *Medicago truncatula*, plante modèle des légumineuses, par le pathotype II (moyennement agressif) de *A. rabiei* montre que celui-ci est un parasite potentiel de cette plante.

L'expression de 9 gènes de défense chez deux lignées de *M. truncatula* (A17 et F83005.5) est étudiée par qRT-PCR. Ces gènes représentent des: PR protéines, phytoalexines, et inhibiteurs de protéase. Ils peuvent contribuer chacun soit directement soit indirectement à la défense contre des attaques de pathogènes.

Les protéines de défense (PR5 et chitinase) montrent des profils d'expression différents chez les deux lignées. Les gènes codant pour les protéines de défense, PR1, β -1,3-Glucanase et le gène Pi20 inhibiteur des protéinases à sérine montrent des profils d'expression similaires chez les deux lignées. Le gène codant la PR10 et trois gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes, la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), la flavone synthase (FS) et la chorismate synthase (CS) ne montrent pas de modification significative dans leur expression. La PR5 peut constituer un bon marqueur de résistance chez *M. truncatula*.

Mots clés : *Ascochyta rabiei*, *Cicer arietinum*, caractérisation du pathogène, microsatellites, pathotypes, *Medicago truncatula*, expression de gènes de défense.

Abstract

Sixteen isolates of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. used in this study were obtained from blight infected chickpea plants collected from six regions of northwestern Algeria. They show cultural, morphological and pathogenic variability.

Pathogenic study revealed the existence of a pathotype III (very aggressive) in two different regions.

Molecular study based on the use of microsatellite primers, (M13), (ATC) 5, (GAA) 5, (TGTC) 4, did not detect any polymorphism. On the other hand the MAT primers reveal occurrence of two mating types (MAT1-1 and MAT1-2) in most regions.

Inoculation of *Medicago truncatula*, a model plant of legumes, by pathotype II of *A. rabiei* (moderately aggressive) shows that this is a potential parasite of this plant.

The expression of 9 defense genes in two *M. truncatula* lines (A17 and F83005.5) is studied by qRT-PCR. These genes represent: RP proteins, phytoalexins, and protease inhibitors. They can contribute either directly or indirectly to defense against attacks by pathogens.

The defense proteins (PR5 and chitinase) show different expression profiles in both lines. The genes encoding the proteins PR1, β -1,3-Glucanase and Pi20 gene which inhibit serine proteinases, show similar patterns of expression in both lines.

The gene encoding PR10 and three genes involved in the flavonoid biosynthesis pathway, phenylalanine ammonia-lyase (PAL), flavone synthase (FS) and chorismate synthase (CS) show no significant change in their expression. PR5 may be a good marker of resistance in *M. truncatula*.

Key words: *Ascochyta rabiei*, *Cicer arietinum*, characterization of the pathogen, microsatellites, pathotypes, *Medicago truncatula*, expression of defense genes.

ملخص :

يعتبر التبقع الأسكوكيبي الناجم عن الفطر *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr واحد من أكثر الأمراض الضارة لنبات الحمص (*Cicer arietinum* L) في الجزائر.

تم عزل ستة عشر عزلة ل *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr من ستة مناطق واقعة في شمال غرب الجزائر، لدراسة تنوعها من حيث الشكل المرفولوجي، تنوعها الإيمراضية ونوع اقتران.

الدراسة الإيمراضية سلطت الضوء على وجود نمط ممرض III (pathotype III) جد عدواني في منطقتين مختلفتين.

الدراسة المستندة على استعمال M13, (ATC)₅, (GAA)₅, (TGTC)₄ لا تسمح بكشف أي متعدد الأشكال من ناحية أخرى. الدراسة للنوع الجنسي MAT تكشف وجود نوعين من التزاوج MAT-1-1 و MAT-1-2، فتم الكشف عنهما في معظم المناطق .

تلقيح الفصاة البرميلية (*Medicago truncatula*) تبنت نموذج من البقوليات عن طريق نمط ممرض II متوسط العدوانية للإسكوكيطة رابي (*Ascochyta rabiei*) ، يبين أن هذا الأخير يمثل طفيلي محتمل لهذه النبتة.

التعبير عند تسعة جينات مقاومة عند الفصاة البرميلية (F83005.5) و (A17) المدروس عن طريق qRT-PCT أن هذه الجينات تمثل بروتينات PR, فيتوألوكسين و مثبط البروتيناز يمكنهم المساهمة بطريقة مباشرة أو غير مباشرة في الدفاع عن الهجمات الممرضة.

بروتينات الدفاع (PR5 و شيتيناز) تبرز ملامح تعبير مختلفة عند النوعين من الفصاة، الجينات المرمزة لبروتينات الدفاع PR1 و β -1,3-غليكوناز و جنية Pi20 المثبطة لبروتيناز السرين تبرز ملامح تعبير مماثلة عند النوعين من الفصاة. الجنية المرمزة بالإضافة إلى ثلاثة جينات مشاركة في طريقة التركيب البيولوجي للمركبات الفلافونية، الفينيل ألانين أمونواليياز (PAL) ، الفلافون سينتاز (FS) و الكريسمنتاز (CS) لا تبرز أي تغيير موثق في تعبيرها.

PR5 يمكن أن يمثل محدد نوعي للمقاومة عند الفصاة البرميلية.

كلمات مفتاحية :

Ascochyta rabiei، *Cicer arietinum* دراسة مورفولوجية، تنوع إيمراضية، نوع اقتران، نمط ممرض،

الفصاة البرميلية (*Medicago truncatula*)، تعبير جينات الدفاع

Liste des figures

- Figure 1** Dissémination du pois chiche à travers le monde
- Figure 2** Evolution de la production du pois chiche dans le monde
- Figure 3** Evolution des superficies emblavées, de la production et du rendement du pois chiche entre 2000 et 2014
- Figure 4** Caractères botaniques de *Cicer arietinum*
- Figure 5** Graine de pois chiche (*Cicer arietinum* L.)
- Figure 6** Pois chiche : Type Desi et type Kabuli
- Figure 7** Fructifications sexuelles de *Didymella rabiei*
- Figure 8** Pycnides et pycnidiospores de *Ascochyta rabiei*
- Figure 9** Dégâts de l'antracnose de pois chiche à Aïn Temouchent
- Figure 10** Lésions nécrotiques causées par *Ascochyta rabiei*
- Figure 11** Symptômes d'antracnose sur gousse et graines
- Figure 12** Cycle épidémique de l'antracnose du pois chiche
- Figure 13** Feuilles, fleurs, gousses et graines de *Medicago truncatula*
- Figure 14** Résistance à la pénétration de l'appressorium de *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* associée à la paroi cellulaire de l'orge
- Figure 15** Formation d'une gaine autour d'un hyphé pénétrant dans une paroi cellulaire
- Figure 16** Biosynthèse de la lignine à partir de la phénylalanine
- Figure 17** Biosynthèse des principales classes de phytoalexines
- Figure 18** Position géographique des six zones d'étude et des régions de collecte des échantillons de pois chiche
- Figure 19** Disposition des plantes à l'intérieur des boîtes transparentes avant inoculation
- Figure 20** Dispositif expérimental de l'inoculation de plantes entières de *M. truncatula* par *A. rabiei*
- Figure 21** Dispositif expérimental utilisé pour l'inoculation des feuilles détachées
- Figure 22** Indices de maladie établis en utilisant des feuilles détachées de *Medicago truncatula*
- Figure 23** Etapes de décoloration des tissus dans une solution de chloroforme-éthanol
- Figure 24** Coloration des tissus des lignées A17 et F83005.5 avec le bleu d'aniline lactophéno

- Figure 25** Aspects cultureux des isolats de *Ascochyta rabiei* sur milieu de culture CSMDA
- Figure 26** Exemple de zonation (cas de l'isolat R1) sur milieu de culture CSMDA
- Figure 27** Exemple de conidies de *A. rabiei* (M2) (X 400)
- Figure 28** Sporulation des isolats de *Ascochyta rabiei*
- Figure 29** Corrélation entre la croissance et la sporulation des isolats de *A. rabiei*
- Figure 30** Plantes de la lignée Flip 9393C montrant des symptômes sévères d'antracnose
- Figure 31** Plantes de la lignée ILC 3279 montrant des symptômes sévères d'antracnose
- Figure 32** Corrélation entre l'agressivité et la sporulation des isolats de *A. rabiei*
- Figure 33** Sévérité des symptômes sur les plantes de ILC 3279 suite à leur inoculation par une suspension sporale (5×10^5 spores/ml) de l'isolat M2
- Figure 34** Profils électrophorétiques indiquant l'amplification par PCR des régions ITS1 et ITS4
- Figure 35** Profils électrophorétiques de *Ascochyta rabiei* obtenus avec des amorces microsatellites
- Figure 36** Symptômes provoqués par *A. rabiei* sur les plantules A17 et F83005.5
- Figure 37** Evolution des symptômes chez les plantules de la lignée A17 inoculées avec *A. rabiei*
- Figure 38** Evolution des symptômes chez les plantules de la lignée F83005.5 inoculées avec *A. rabiei*
- Figure 39** Développement des symptômes sur plantules (lignées A17 et F83005.5) inoculées avec *A. rabiei*
- Figure 40** Développement de symptômes sur les folioles de *M. truncatula* inoculée par *A. rabiei*
- Figure 41** Cinétique d'apparition des pycnides chez les folioles de *M. truncatula*
- Figure 42** Aspect des pycnides de *A. rabiei* sur folioles des lignées A17 inoculées artificiellement
- Figure 43** Analyse microscopique des feuilles de deux lignées de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec un isolat de *Ascochyta rabiei*
- Figure 44** Expression des gènes de défense (PR1, PR5, PR10, Pi20) chez les folioles de *M. truncatula*
- Figure 45** Expression des gènes de défense (Phénylalanine-ammonialyase, β , 1-3 glucanase, Chorismate synthase, Flavone synthase et chitinase) chez les folioles de *M. truncatula* inoculées par *A. rabiei*

Liste des tableaux

- Tableau 01** Principaux pays producteurs de pois chiche dans le monde
- Tableau 02** Principales zones de culture du pois chiche en Algérie
- Tableau 03** Variétés locales de pois chiche décrites en Algérie
- Tableau 04** Teneur en vitamines dans différentes légumineuses
- Tableau 05** Principales maladies fongiques du pois chiche dans le monde
- Tableau 06** Principales maladies virales affectant le pois chiche
- Tableau 07** Principales maladies bactériennes affectant le pois chiche
- Tableau 08** Pertes de rendement de pois chiche causées par *Ascochyta rabiei* et observées dans différents pays
- Tableau 09** Classification de *Medicago truncatula*
- Tableau 10** Distribution des populations de *Medicago truncatula* collectées dans différents pays et composant les collections mondiales existantes
- Tableau 11** Les champignons donnant des réponses différentielles sur des populations de *M. truncatula*
- Tableau 12** Activité biologique et sites d'actions de 17 classes de protéines PR
- Tableau 13** Composition du milieu CSMDA
- Tableau 14** Origine géographique et désignation des isolats de *A. rabiei*
- Tableau 15** Echelle de notation des symptômes sur plantes entières de *M. truncatula*
- Tableau 16** Mélange réactionnel pour la transcription inverse
- Tableau 17** Amorces utilisées pour les PCR
- Tableau 18** Caractéristiques morphologiques des isolats de *A. rabiei* du nord-ouest algérien après 10 jours de culture sur CSMDA
- Tableau 19** Analyse de variance pour la croissance mycélienne des isolats de *A. rabiei*
- Tableau 20** Diamètre moyen des colonies de *A. rabiei* et dimensions des conidies, après 10 jours d'incubation sur milieu CSMDA
- Tableau 21** Analyse de variance pour la longueur des conidies de *A. rabiei*
- Tableau 22** Analyse de variance pour la largeur des conidies de *A. rabiei*
- Tableau 23** Analyse de variance pour la sporulation des isolats de *A. rabiei*

- Tableau 24** Analyse de variance pour la sporulation des isolats de *A. rabiei* dans les régions, après 10 jours d'incubation à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ sur milieu CSMDA
- Tableau 25** Classification des régions en groupes homogènes selon la valeur moyenne de sporulation des isolats
- Tableau 26** Notation de la maladie (1 à 9) causée par les isolats de *Ascochyta rabiei* sur 11 lignées différentielles de pois chiche
- Tableau 27** Réaction des lignées de pois chiche 14 jours après inoculation par *A. rabiei*
- Tableau 28** Analyse de variance du pouvoir pathogène des isolats de *A. rabiei* après inoculation de onze lignées de pois chiche
- Tableau 29** Analyse de variance du pouvoir pathogène des isolats de *A. rabiei* après inoculation de trois lignées différentielles
- Tableau 30** Pathotypes de *A. rabiei* caractérisés par l'inoculation de 3 lignées de pois chiche différentielles
- Tableau 31** Résultats du dosage de la concentration de l'ADN
- Tableau 32** Distribution des mating types de *A. rabiei* dans différentes régions
- Tableau 33** Analyse de variance de l'indice de maladie des lignées de *M. truncatula* (plantules entières inoculées par *A. rabiei*).
- Tableau 34** Analyse de variance du nombre de pycnides sur folioles de *M. truncatula*
- Tableau 35-43** Analyse de variance de l'expression des gènes de défense

Liste des abréviations

ADN(r)	Acide désoxyribonucléique (ribosomal)
BET	Bromure d'éthyidium
Ct	cycle threshold/ crossing point
dNTP mix	désoxynucléotide triphosphate (mélange)
dpi	jour(s) après inoculation/day(s) post inoculation
EDTA	éthylène diamine tétra-acétate
IGS	intergenic spacer
ITS	Internal transcribed spacers
ICARDA	International Center for Agricultural Research in the Dry Areas
ICRISAT	The International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics
ITGC	Institut Technique des Grandes cultures
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PAL	phénylanine ammonialyase
FS	Flavone synthase
CS	Chorismate synthase
Chit	Chitinase
PCR	polymerase chain reaction/réaction de polymérisation en chaîne
PDA	Milieu Potato Dextrose Agar
PDB	Milieu Potato Dextrose Broth
PR-protein	Pathogenesis-Related-Protein
qPCR	PCR quantitative
qsp	quantité suffisante pour
Rnase	Ribonucléase
TAE	Tampon tris-acétate-EDTA
TE	Tampon tris-EDTA
Tris	Trihydroxyméthylaminométhane
Tween	Polyoxyéthylène-sorbitane-monooléate
UHQ	Ultra haute qualité

TABLE DES MATIERES

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	

INTRODUCTION GENERALE

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Généralités sur le pois chiche (*Cicer arietinum* L.)

1.1.	Origine et distribution géographique.....	3
1.2.	Situation de la culture du pois chiche.....	5
1.2.1.	Dans le monde.....	5
1.2.2.	En Algérie.....	6
1.2.2.1.	Evolution des superficies, production et rendements.....	6
1.2.2.2.	Principales zones de culture.....	7
1.2.2.3.	Etat des ressources génétiques.....	8
1.3.	Botanique.....	10
1.3.1.	Taxonomie de la plante.....	10
1.3.2.	Caractères botaniques.....	11
1.3.3.	Types de pois chiche.....	14
1.3.3.1.	Le type Kabuli.....	14
1.3.3.2.	Le type Desi.....	15
1.4.	Importance du pois chiche.....	15
1.4.1.	Valeur nutritionnelle.....	15
1.4.2.	Valeur médicinale.....	16
1.4.3.	Nodulation et fixation d'azote.....	17
1.5.	Exigences écologiques du pois chiche.....	17
1.5.1.	Exigences climatiques.....	17
1.5.5.1.	Température.....	17
1.5.5.2.	Pluviométrie.....	17
1.5.5.3.	Lumière.....	18
1.5.2.	Exigences édaphiques et nutritionnelles.....	18
1.6.	Les principales maladies affectant la culture de pois chiche.....	18

Chapitre II : L'antracnose du pois chiche

2.1.	Répartition géographique et importance économique de la maladie.....	22
2.2.	Taxonomie et reproduction de l'agent pathogène.....	23
2.2.1.	Taxonomie et caractéristiques de <i>Ascochyta rabiei</i>	23
2.2.2.	La reproduction.....	24
2.2.2.1.	Reproduction sexuée.....	24
2.2.2.2.	Reproduction asexuée.....	25
2.3.	Symptomatologie de la maladie.....	25
2.4.	Biologie et épidémiologie du pathogène.....	27
2.4.1	Survie du pathogène.....	27
2.4.2.	Epidémiologie du pathogène.....	28
2.5.	Pathogénicité.....	29
2.5.1.	Histopathologie.....	29
2.5.2.	Les pathotoxines et les enzymes impliquées dans l'infection.....	30
2.5.3.	Variabilité du pouvoir pathogène.....	30
2.6.	Le polymorphisme génomique.....	31
2.6.1.	polymorphisme de séquence.....	31
2.6.2.	Polymorphisme de nombre d'unités de répétition.....	32
2.7.	Méthodes de lutte contre l'antracnose.....	32
2.7.1.	Lutte culturale.....	32
2.7.2.	Lutte chimique.....	33
2.7.3.	Lutte biologique.....	33
2.7.4.	Lutte génétique.....	33

Chapitre III : *Medicago truncatula* Gaertn

3.1.	Historique.....	35
3.2.	Classification botanique de <i>Medicago truncatula</i> Gaertn.....	35
3.3.	Propriétés du modèle <i>Medicago truncatula</i>	37
3.4.	Intérêt économique et scientifique de <i>Medicago truncatula</i>	38
3.4.1.	Intérêt agronomique.....	38
3.4.2.	Intérêt génétique.....	39
3.4.3.	<i>Medicago truncatula</i> , espèce de référence pour la génomique comparative des légumineuses.....	39
3.5.	Les Ressources naturelles chez <i>M. truncatula</i>	40
3.6.	Interactions de <i>M. truncatula</i> avec les insectes et les microorganismes.....	41
3.6.1.	Interactions avec les insectes.....	41
3.6.2.	Interactions avec les microorganismes symbiotiques.....	42
3.6.3.	Interactions avec les agents pathogènes.....	42

Chapitre IV : Mécanismes de défense chez les plantes

4.1.	La formation de barrières structurales.....	46
4.1.1.	La formation de papilles et d'appositions pariétales.....	46
4.1.1.1.	La callose.....	47
4.1.1.2.	La pectine.....	48
4.1.1.3.	La lignine.....	48
4.1.2.	L'occlusion des espaces intercellulaires.....	49
4.2.	La production de métabolites secondaires.....	49
4.2.1.	Composés phénoliques constitutifs de défense.....	50
4.2.2.	Composés phénoliques de défense induits.....	50
4.3.	La production de PR protéines.....	51
4.3.1.	Les protéines PR-1.....	53
4.3.2.	Les hydrolases: glucanases et chitinases.....	53
4.3.2.1.	Les β -1,3-glucanases.....	54
4.3.2.2.	Les chitinases.....	54
4.3.3.	Les oxydases.....	55
4.3.3.1.	Les peroxydases.....	55
4.3.3.2.	Les oxalates oxydases.....	55
4.3.4.	Les ribonucléases.....	56
4.3.5.	Les protéines thaumatines-like.....	56
4.3.6.	Les défensines et les thionines.....	56

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

Chapitre I : Matériel biologique et culture

1.1.	Matériel fongique.....	57
1.1.1.	Sites de collecte des échantillons.....	57
1.1.2.	Culture et conservation.....	58
1.2.	Matériel végétal.....	59
1.2.1.	Pois chiche.....	59
1.2.1.1.	Origine des lignées.....	59
1.2.1.2.	Culture des plantes.....	60
1.2.2.	<i>Medicago truncatula</i>	60
1.2.2.1.	Origine des lignées.....	60
1.2.2.2.	Culture des plantes.....	60

Chapitre II : Caractérisation *in vitro* des isolats de *Ascochyta rabiei*

2.1.	Caractérisation culturale.....	61
2.2.	Caractérisation morphologique.....	61
2.2.1.	Evaluation de la croissance mycélienne.....	61

2.2.2.	Evaluation de la sporulation.....	61
--------	-----------------------------------	----

Chapitre III : Essais d'inoculation et suivi des symptômes

3.1.	Production de l'inoculum.....	63
3.2.	Etude de la pathogénicité des isolats de <i>A. rabiei</i> sur les lignées de pois chiche.....	63
3.2.1.	Comportement des isolats de <i>A. rabiei</i> sur une gamme d'hôtes.....	63
3.2.1.1.	Inoculation.....	63
3.2.1.2.	Notation de la maladie.....	64
3.2.2.	Détermination des pathotypes.....	65
3.2.2.1.	Inoculation.....	65
3.2.2.2.	Notation de la maladie.....	65
3.3.	Tests de pathogénicité sur <i>Medicago truncatula</i>	66
3.3.1.	Test de pathogénicité sur plantes entières.....	66
3.3.1.1.	Inoculation.....	66
3.3.1.2.	Notation de la maladie.....	66
3.3.2.	Test de pathogénicité sur feuilles détachées.....	67
3.3.2.1.	Inoculation.....	67
3.3.3.2.	Notation de la maladie.....	68

Chapitre IV : Méthodes de microscopie

4.1.	Mesure des dimensions des conidies des isolats de <i>A. rabiei</i>	70
4.2.	Analyse microscopique des folioles de <i>M. truncatula</i> inoculées par <i>A. rabiei</i>	70
4.2.1.	Fixation et décoloration des tissus.....	70
4.2.2.	Coloration au bleu d'aniline-lactophénol.....	70
4.2.3.	Observations microscopiques.....	70

Chapitre V : Méthodes de biologie moléculaire

5.1.	Cultures de <i>Ascochyta rabiei</i>	72
5.2.	Extraction de l'ADN par la technique au phénol/chloroforme/alcool isoamylique.....	72
5.3.	Vérification de la concentration et de la pureté de l'ADN.....	73
5.4.	Amplification de l'ADN par PCR et étude des régions ITS.....	74
5.4.1.	Principe de la PCR.....	74
5.4.2.	PCR et conditions de réalisation.....	74
5.4.3.	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	75
5.4.4.	Séquençage des régions ITS.....	76
5.5.	Exploration du polymorphisme par les marqueurs microsatellites.....	76
5.6.	Identification des mating type.....	78

5.6.1.	PCR et conditions de réalisation.....	78
5.6.2.	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	79
5.7.	Etude de l'expression des gènes de défense de <i>M. truncatula</i>	79
5.7.1.	Inoculation des feuilles détachées.....	79
5.7.2.	Extraction de l'ARN.....	80
5.7.3.	qRT-PCR pour l'étude de l'expression de gènes.....	81
5.7.3.1.	Synthèse de l'ADN _C	81
5.7.3.2.	PCR quantitative.....	82

Chapitre VI : Méthodes statistiques

6.1.	Expériences sur l'interaction <i>A. rabiei/Cicer arietinum</i>	84
6.2.	Expériences sur l'interaction <i>A. rabiei/Medicago truncatula</i>	84

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre I : Variabilité culturelle et morphologique des isolats de *Ascochyta rabiei*

1.1.	Résultats.....	85
1.1.1.	Variabilité culturelle de <i>Ascochyta rabiei</i> sur milieu de culture CSMDA.....	85
1.1.1.1.	Variation de la pigmentation des colonies et de la couleur du cirrhe.....	85
1.1.1.2.	Zonation des colonies.....	86
1.1.2.	Variabilité morphologique sur milieu CSMDA.....	87
1.1.2.1.	Variation du diamètre des colonies et de la croissance mycélienne.....	87
1.1.2.2.	Dimension des conidies.....	88
1.1.2.3.	Variation de la sporulation.....	89
1.2.	Discussion.....	92

Chapitre II : Diversité pathogénique des isolats de *Ascochyta rabiei*

2.1.	Résultats.....	94
2.1.1.	Variabilité du pouvoir pathogène des isolats de <i>A. rabiei</i>	94
2.1.2.	Identification des pathotypes.....	98
2.2.	Discussion.....	101

PUBLICATION

Chapitre III : Diversité génétique des isolats de *Ascochyta rabiei*

3.1.	Résultats.....	103
3.1.1.	Analyse de la pureté de l'ADN.....	103
3.1.2.	Séquençage des régions ITS.....	103
3.1.3.	Variabilité des isolats de <i>Ascochyta rabiei</i>	105

3.1.4.	Détermination des groupes sexués de compatibilité présents dans le nord-ouest algérien.....	107
3.2.	Discussion.....	108
Chapitre IV: Caractérisation de l'interaction <i>Ascochyta rabiei</i> / <i>Medicago truncatula</i>		
4.1.	Résultats.....	110
4.1.1.	<i>Medicago truncatula</i> est une plante hôte pour <i>Ascochyta rabiei</i>	111
4.1.1.1.	Symptomatologie de la maladie sur plantules entières.....	111
4.1.1.2.	Symptomatologie de la maladie sur feuilles détachées.....	116
4.1.1.2.1	Evolution de la maladie.....	116
4.1.1.2.2	Temps de latence.....	117
4.1.1.2.3	Analyse microscopique des feuilles détachées de <i>M. truncatula</i>	118
4.1.2.	Modification de l'expression des gènes de défense chez <i>M. truncatula</i> après inoculation par <i>A. rabiei</i>	120
4.2.	Discussion.....	126
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....		130
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		132
ANNEXES.....		156

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est l'une des légumineuses les plus importantes produites dans la région du bassin Méditerranéen. L'Algérie produit chaque année environ 22000 tonnes de pois chiche sur une superficie d'environ 33295 ha (FAO, 2016). Mais à ce niveau, la productivité et la production demeurent trop faibles.

Les semis de printemps qui exposent la culture à la sécheresse durant la période critique de la floraison, coïncidant avec certaines maladies et ravageurs, constituent les principales causes de la faiblesse des rendements. L'antracnose, causée par *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labrousse (syn. *Phoma rabiei* (Pass.) Khune et Kapoor), téléomorphe *Didymella rabiei* (Kovachevski) vs. Arx (syn. *Mycosphaerella rabiei* Kovachevski), semble être la maladie la plus préjudiciable à la culture de pois chiche. Lorsque les conditions de l'environnement sont favorables à la croissance et à la sporulation du pathogène, cette affection cause, certaines années, d'importantes pertes de rendements atteignant 100 % (Nene et Reddy, 1987).

En Algérie aussi, sur le pois chiche, l'antracnose est la maladie la plus fréquemment rencontrée et qui cause le plus de dégâts. Des données de prospections ont montré la présence et l'extension de l'antracnose avec des baisses de rendement pouvant aller jusqu'à 100% (Bouznad et al., 1996). Mabsoute et al. (1996) signalent qu'en Algérie et dans les autres pays du Maghreb, l'antracnose constitue une contrainte majeure à la culture de pois chiche.

Le stade téléomorphe (*Didymella rabiei*), hétérothallique, nécessite la présence de deux types de thalle, MAT-1-1 et MAT1-2, pour l'accomplissement de la reproduction sexuée. Par ce moyen, le stade téléomorphe contribue à l'hétérozygotie des descendants et à l'obtention de nouvelles combinaisons de virulence, favorisant l'apparition de nouveaux pathotypes (Kaiser, 1997b). C'est pourquoi tout programme de lutte contre l'antracnose et tout programme d'introduction de nouveaux cultivars en Algérie doit s'appuyer sur une bonne connaissance de la variabilité morphologique, pathogénique et la diversité génétique des populations de l'agent pathogène.

Les études menées en Algérie sur la caractérisation morphologique, pathogénique et culturale du parasite montrent une grande variabilité sur ces caractères (Labdi, 1990). Cependant, des travaux consacrés plus particulièrement à l'étude de la diversité génétique des populations du champignon ont rarement été abordés. Pour cela, nous avons étudié cet aspect par la recherche de liens éventuels entre ces caractères précédents et la diversité génétique des isolats de l'Ouest algérien.

Parmi les actions prioritaires de recherches retenues dans le cadre de différents programmes d'amélioration génétique des légumineuses, l'amélioration de la résistance aux maladies est privilégiée. Ces dernières années l'intérêt des chercheurs s'est porté sur *Medicago truncatula* (la luzerne tronquée), comme plante modèle pour examiner la résistance aux maladies des légumineuses (Frugoli et Harris, 2001). L'importance de cette espèce réside dans sa sensibilité à une gamme importante d'agents pathogènes. D'ailleurs des sources de résistance ont été décrites chez cette plante, par exemple contre le *Phoma medicaginis* (Djébali *et al.*, 2007) et *Erysiphe pisi* (Ameline-Torregrosa *et al.*, 2008). Elle présente entre autres, plusieurs avantages qui la prédisposent aux études génétiques. C'est une plante annuelle, diploïde, autogame avec un faible niveau de ploïdie. C'est aussi une espèce avec un génome de petite taille, 5 100 pb (Blondon *et al.*, 1994). Ceci nous a influencé pour étudier l'interaction du couple *M. truncatula/Ascochyta rabiei*.

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

Généralités sur le pois chiche (*Cicer arietinum* L.)

1.1. Origine et distribution géographique

Le pois chiche cultivé, *Cicer arietinum* L., est l'une des premières légumineuses à graines à être domestiquée dans le vieux monde, il y a environ 7000 ans (Van Der Maesen, 1972). Il est probablement originaire de l'actuel sud-est de la Turquie (Ladizinsky, 1975) et les régions voisines de la Syrie (Staginnus et al., 1999 ; Sharma et muehlbauer, 2007). La Turquie est considérée comme le centre d'origine du pois chiche, car c'est dans ce pays que son ancêtre présumé, *C. reticulatum*, a été trouvé (Zohary et al. 2012). La conclusion concernant le centre d'origine du pois chiche cultivé est basée sur des similitudes morphologiques des plantes et de leur habitat et la facilité d'hybrider *C. reticulatum* avec le pois chiche cultivé *C. arietinum*.

Laumont et Chevassus (1956) et Bistolfi et Mardam-Bey (1998) rapportent que le pois chiche a été domestiqué aux confins de la Turquie et de la Syrie au VII^e millénaire avant notre ère. Les premiers sites répertoriés sont Hacilar (5500 av. J.-C.) en Turquie et Jéricho (625 av. J.-C.) en Palestine. Il s'est diffusé progressivement vers l'ouest de la Méditerranée, ainsi qu'en Asie orientale et australe et en Afrique de l'Est. Il a atteint le sous-continent indien 2000 ans avant J.-C. La culture du pois chiche connaît une expansion dans les pays où son introduction est récente, comme l'Australie, la Nouvelle-Zélande, les Etats-Unis et le Canada. (Bejiga et Van der Maesen, 2006).

Duke (1981) rapporte que ce légume sec a conquis l'Europe durant le moyen-âge après que les croisés l'aient redécouvert au Proche-Orient. Sa culture et sa consommation ont toutefois été attestées par des sources écrites et archéologiques bien avant, au moins dès le IX^e siècle.

Parmi les cultures néolithiques de l'Asie de l'Ouest, le pois chiche a une trajectoire évolutive unique, passant par une série de goulets d'étranglement de ses origines en tant que plante annuelle d'hiver en méditerranée (*Cicer reticulatum*), progéniteur sauvage de *Cicer arietinum*, à son statut actuel de culture de printemps au Sud de l'Asie et en méditerranée. Les résidus de pois chiche néolithique sont relativement communs dans toute la méditerranée orientale, où la culture était vraisemblablement semée en automne et cultivée comme une annuelle d'hiver, comme toutes les autres cultures néolithiques de l'Asie occidentale.

Après le Néolithique, le pois chiche semble souffrir d'un déclin, réapparaissant à l'âge du bronze en Asie du Sud et dans une région beaucoup plus réduite, une distribution plus méridionale en méditerranée. Abbo et *al.* (2003) attribuent ce déclin méditerranéen aux effets catastrophiques de l'anthracnose, et pensent que le pois chiche a ré-émergé à l'âge du bronze grâce aux semis de printemps qui ont permis d'éviter la pression de maladie, coïncidant avec l'introduction de nouvelles cultures de semis printanier comme le sorgho et le millet etc...

Par la suite, le pois chiche a consolidé sa distribution en Asie du Sud et de l'Ouest (tous deux dominant encore aujourd'hui la production mondiale) et est apparu en Ethiopie à l'âge du fer (Fig. 1).

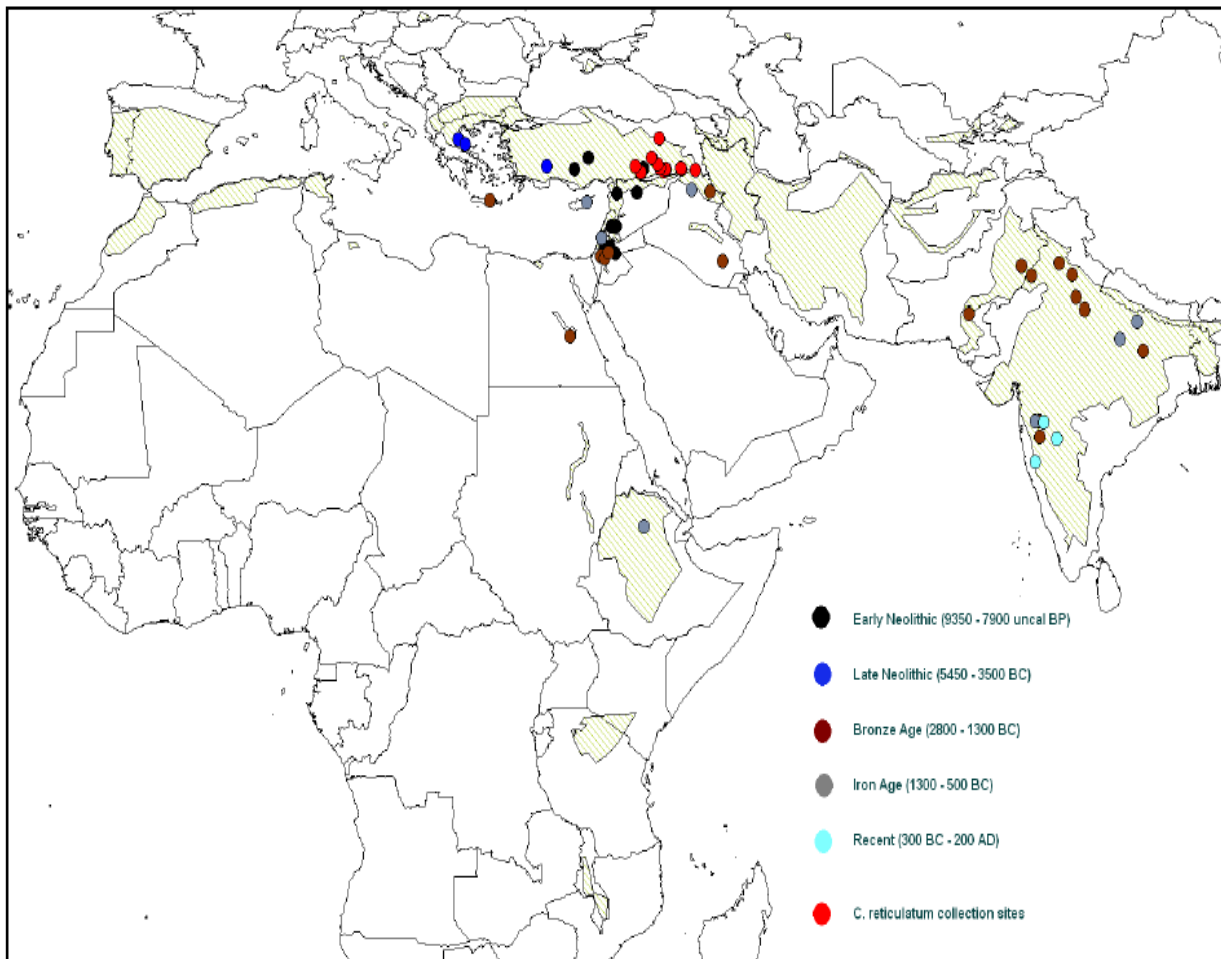


Figure 1: Dissémination du pois chiche à travers l'Ancien Monde, de la plante annuelle d'hiver (*C. reticulatum*, progéniteur sauvage) étroitement répartie en méditerranée, aux cultures répandues (zones hachurées). Les données sont basées sur des sites archéologiques contenant le pois chiche ou les espèces de Cicer (Berger, 2014).

1.2. Situation de la culture du pois chiche

1.2.1. Dans le monde

Le pois chiche est cultivé dans les 5 continents et dans plus de 50 pays (FAO, 2015). Plus de 90% des superficies sont situées dans les pays développés. Le continent asiatique (sud et sud-est) détient 9% de la production mondiale (Gaur et *al.*, 2012 ; Millán et *al.*, 2015) (Fig. 2). Les rendements de cette culture dépendent de l'importance des attaques parasitaires et des conditions climatiques, notamment le volume des pluies. La sécheresse est le principal facteur limitant le rendement. La valeur des pertes causées annuellement par cette dernière est estimée à 1,2 milliards de dollars dans le monde (Houasli et *al.*, 2014).

Pendant les vingt dernières années, le pois chiche a été classé troisième légumineuse à grains la plus cultivée dans le monde, après le haricot sec et le petit pois (FAO, 2015).

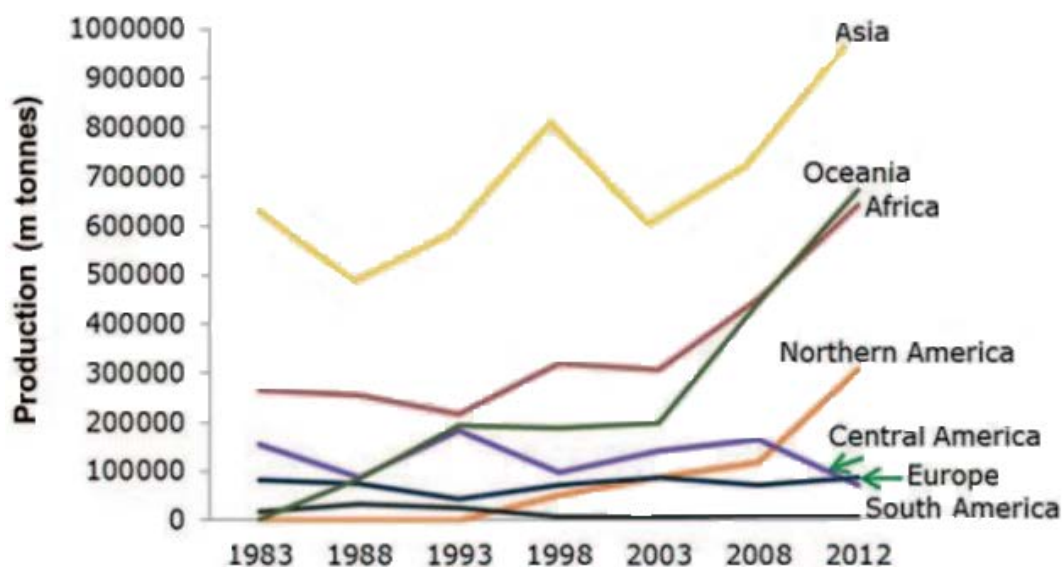


Figure 2 : Evolution de la production de pois chiche dans le monde (Millán et *al.*, 2015).

Les plus grands pays producteurs de cette espèce sont : l'Inde, l'Australie, le Myanmar (Ex. Birmanie), l'Ethiopie, la Turquie, l'Iran, le Mexique, les Etats Unis d'Amérique et le Canada (Tab.1). L'Inde produit les 2/3 de la production mondiale. Il est le premier pays producteur, mais il en est aussi le plus gros importateur (Fabre, 2008; Ghosh et *al.*, 2013; FAO, 2015).

Les plus grands pays exportateurs sont: l'Australie, l'Inde, le Mexique, l'Argentine, l'Ethiopie, le Canada, les États-Unis d'Amérique, la République-Unie de Tanzanie, les Émirats arabes unis et la Turquie, alors que les principaux pays importateurs sont l'Inde, le

Bangladesh, l'Espagne, l'Algérie, les Émirats arabes unis, l'Espagne et le Pakistan (FAO, 2015). Par ailleurs, le Canada exporte plus de la moitié de sa production et vise le marché indien et européen (55 % de la récolte type Desi; 45 % de Kabuli), alors que la Turquie est un grand exportateur et produit essentiellement des grains de type Kabuli (Fabre, 2008).

La production mondiale est composée à 85 % du type Desi et à 25 % du type Kabuli. Les pays du sous-continent indien et l'Australie produisent surtout le type Desi, alors que le reste des pays produisent le type Kabuli (Fabre, 2008).

Tableau 1: Principaux pays producteurs de pois chiche dans le monde (campagne 2014)

Pays	Superficie (ha)	Production (tonnes)	Rendement (qx/ha)
Inde	9 927 000	9 880 000	9,953
Australie	507 800	629 400	12,395
Myanmar	384 212	562 163	14,631
Ethiopie	239 755	458 682	19,131
Turquie	388 169	450 000	11,593
Pakistan	949 513	399 030	4,202
Iran	594 489	261 616	4,401
Mexique	106 434	171 665	16,129
États-Unis d'Amérique	85 834	127 369	14,839
Canada	66 000	123 000	18,636

Source : FAO (2016). [En ligne], <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC>.

1.2.2. En Algérie

1.2.2.1. Evolution des superficies, production et rendement

En Algérie, le pois chiche constitue la seconde légumineuse cultivée après la fève (*Vicia faba* L.) (Abdelguerfi et al., 2001). La superficie du pois chiche a augmenté durant la période 1961- 1990. Par la suite, elle a présenté une régression constante passant de 47 061 ha durant la période 1981-1990 à 21 799 ha durant la période 2001-2010. Les productions fluctuent d'une décennie à l'autre. Les productions les plus importantes ont été observées durant la décennie 1991-2000, avec une production en 1992 de 261 320 qx. La production de l'année 2010 a atteint 234 737 qx. Les rendements sont très variables d'une décennie à l'autre. Ils varient en moyenne de 3 à 7 q/ ha (Zine-Zikara et al., 2015).

La production de pois chiche en Algérie a commencé à présenter une hausse importante après 2008, année durant laquelle on enregistre les chiffres les plus bas depuis le début du 21^{ème} siècle (Fig. 3). En 2013, nous remarquons une légère baisse des superficies emblavées mais ceci est resté sans répercussion sur la production qui n'a pas cessé

d'augmenter. En 2014, les superficies consacrées au pois chiche sont plus importantes, ce qui donne lieu à une meilleure production (35 118 tonnes en 2014 contre 34 980 tonnes en 2013), cependant le rendement à l'hectare est plus faible (10, 54q/ha contre 11, 93q/ha).

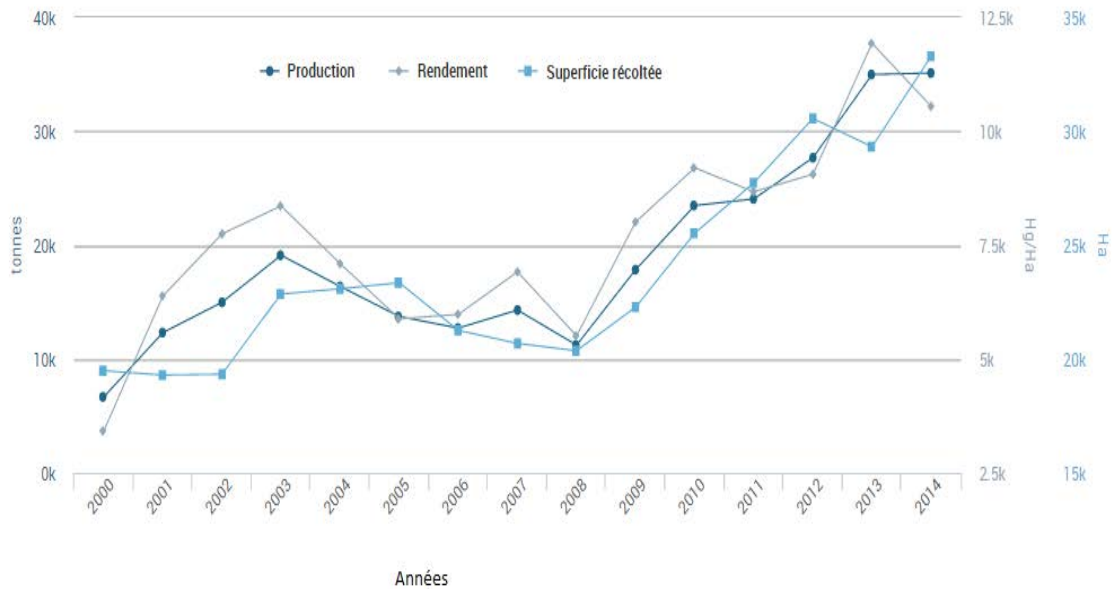


Figure 3: Evolution des superficies emblavées, de la production et du rendement du pois chiche entre 2000 et 2014 (FAO, 2015).

La hausse de la production enregistrée ces dernières années peut être attribuée à l'extension des terres réservées aux légumineuses, atteignant durant la saison 2013-2014 une superficie de plus de 33 295 hectares, ainsi qu'à l'adhésion des agriculteurs au programme national de développement des filières légumineuses. Les fellahs adhérant à la production de pois chiche bénéficient d'un soutien du Fonds National de Régulation Agricole et de Développement Rural, de l'ordre de 7.000 DA/q pour l'acquisition des semences.

Au cours des 30 dernières années, le rendement est passé de 262 kg/ha à 936 kg/ha, mais cela reste trop faible par rapport aux besoins de la population. L'Algérie importe plus de 200% de sa production (66 000 tonnes) (Madrid et al., 2015).

1.2.2.2. Principales zones de culture

La région nord de l'Algérie englobe la majorité des superficies cultivées en légumineuses alimentaires, avec plus de 52,83 % pour la région nord-ouest (Zine-Zikara et al., 2015).

Le pois chiche est cultivé dans les zones de culture de blé dur c'est-à-dire les terres fertiles où la moyenne pluviométrique est supérieure à 400 mm et où le sol est profond avec

une rétention hydrique importante (Tab. 2). La culture de printemps est surtout localisée au nord-ouest du pays (Tlemcen, Aïn Temouchent, Sidi Bel Abbes) au nord-est (Skikda, Guelma, Mila) et au centre (Chlef, Tipaza, Tizi-ouzou, Bouira). Aïn Temouchent et Tissemsilt sont les régions les plus productives (FAO, 2016).

Tableau 2 : Principales zones de culture de pois chiche en Algérie (Anonyme, 1988).

Zones	Pluviométrie moyenne (mm.an ⁻¹)	Localisation
Plaines littorales et sub-littorales	P > 600	Alger, Guelma, Annaba et Skikda.
Plaines d'altitude de 700 à 900 m	500 < P < 600	Saida, Tiaret, Médéa, Guelma, Bordj Bou Arreridj, Setif et le nord des Aures.
Hautes plaines telliennes	400 < P < 500	Tlemcen, Aïn Temouchent, chlef, Relizane, Mila, Sidi Bel Abbes, Bouira et Tizi-ouzou.

Les wilayate qui totalisent plus 90 % de la superficie cultivée en pois chiche en Algérie sont respectivement : Aïn Temouchent (23,98 %), Tlemcen (20,48 %), Mascara (12,54 %), Mostaganem (8,81 %), Chlef (6,48 %), Sidi Bel Abbes (5,42 %), Skikda (4,11 %), Guelma (3,94 %), Aïn Defla (2,57 %), Médéa (1,79 %) et Relizane (1,29 %) (Zine-Zikara et *al.*, 2015).

1.2.2.3. Etat des ressources génétiques

L'Algérie ne fait pas partie de l'aire de distribution du genre *Cicer*. Les variétés de pois chiche cultivées, dites locales, ont été introduites par de nombreuses civilisations. Au fil du temps, ces cultivars se sont adaptés à certaines conditions édaphoclimatiques de l'Algérie et ont été maintenus et adoptés par les agriculteurs (Abdelguerfi-Louar et *al.*, 2000). De 1944 à 1955, trente et une variétés locales ont servi de matériel de base pour des recherches en amélioration, depuis, beaucoup de cultivars locaux ont disparu (Zine-Zikara et *al.*, 2015). Boughrarou (1992) n'a pu caractériser que six cultivars locaux (Sebdou, Sidi Bel Abbés, Rabat 9, Aïn Temouchent, Abdellys et Oran Précoce) dont trois seulement (Aïn Temouchent, Abdellys et Oran Précoce) ont été mentionnés par Laumont et Chevassus (1956) (Tab. 3).

Les efforts de la recherche consentis pour cette légumineuse ont surtout porté sur la sélection. Cette dernière a porté sur les différentes caractéristiques successibles d'exister dans le germoplasme local. En l'occurrence, la capacité de la fixation symbiotique de l'azote de

Partie I : Revue bibliographique

l'air, la hauteur de la plante, la résistance à l'égrenage, la résistance aux maladies cryptogamiques et la tolérance aux stress abiotiques.

Certaines de ces six variétés locales restent encore utilisées telles que Aïn Temouchent, Rabat-9, pendant que d'autres ont disparu (Oran précoce). Ce manque a été, en partie, compensé par des introductions de variétés étrangères, particulièrement les variétés ILC et les FLIP, à port dressé (aptés à la récolte mécanisée), plus tolérantes à l'antracnose. L'introduction et la culture, depuis plusieurs années, de variétés de pois chiche d'hiver importées de la Syrie, de la Turquie ou sélectionnées localement, n'ont pas toujours permis d'atteindre les objectifs nationaux de production. Leur petit calibre a fait qu'elles ne soient plus cultivées (Labdi *et al.*, 2009a).

Tableau 3: Variétés locales de pois chiches décrites en Algérie (Anonyme, 1988)

Variétés	Caractéristiques
Sidi Bel Abbès	Plante haute à port érigé, grain lisse et beige clair, feuillage très dense. Variété précoce
Sebdou	Port étalé à grande envergure, feuillage vert foncé, grain lisse beige marron. Variété précoce
Rabat 9	Plante courte à port érigé, grain ridé, beige clair. Variété tardive
Aïn Temouchent	Plante courte à port érigé, feuillage vert jaune, grain ridé, beige clair. Variété précoce
Abdellys	Port étalé, grande envergure, feuillage très dense vert jaune, grain beige clair, ridé. Variété précoce
Oran Précoce	Port étalé, petite envergure, feuille vert jaune, grain ridé, beige clair. Variété précoce

Il est important de noter que la diversité génétique du pois chiche n'a pas fait l'objet de gestion et de conservation. Les travaux entrepris jusqu'à présent concernaient beaucoup plus les aspects de protection des cultures (phytopathologie et entomologie) de physiologie (stress), de relations symbiotiques et de caractérisation de populations locales dans le cadre des programmes d'institutions comme l'ITGC, l'INRAA, l'INA ou les universités ou dans le cadre de projets du MESRS ou d'institutions internationales ou étrangères (REMAFEVE, AQUAHRIZ, PNUD etc..). Mis à part les travaux réalisés dans le cadre d'un projet PNUD (Programme des nations unis pour le développement où l'accent a été mis sur le pois chiche d'hiver résistant à l'antracnose, des lignées étaient en phase de production de semence au niveau des stations de recherche, il s'agit de : Chetoui 1 ; Flip 84-92c, 84-79c, 85-17c, 84-54c et 82-150c (Zine-Zakara *et al.*, 2015).

La conservation des semences se fait soit par le biais des échanges entre agriculteurs, ou encore en pépinières vivantes (actives), cette situation a fait disparaître la plupart des variétés. Les semenciers ne s'intéressent qu'aux variétés qui au moment de la caractérisation semblent prometteuses en tant que géniteurs, alors qu'il faudrait garder toutes les variétés présentes utilisables ou obsolètes.

La collection et la caractérisation des variétés locales aux marqueurs moléculaires, est la forme la plus indiquée et la plus gérable pour la création des banques de gènes qui seront maintenues dans de petites unités de conservation. Selon Bouzerzour et *al.* (2003), ces petites unités seront adossées à une nouvelle entité qui se chargera de la mission de la conservation de l'agro biodiversité.

1.3. Botanique

1.3.1. Taxonomie de la plante

Le genre *Cicer* appartient à la tribu des *Cicereae*, la sous-famille *Faboideae* ou *Papilionoideae* et à la famille des *Fabacées* ou *légumineuses* (Toker et *al.*, 2014). Il comprend un grand nombre d'espèces qui ont été décrites par Vander-Maessen (1979) (in Benmbarek, 2011) et réparties en trois groupes:

- Espèces annuelles sauvages: *C. reticulatum*, *C. echinospermum*, *C. bijucum*, *C. judaicum*, *C. pinnatifidum*, *C. cuneatum*, *C. yamashitae*, *C. chorassanicum*;
- Espèces pérennes sauvages: *C. montbretii*, *C. microphyllum*, *C. rechingeri*, *C. anotolicum*, *C. floribundum*, *C. pengens*, *C. graecum*;
- Espèce annuelle cultivée: *C. arietinum* L.

Deux espèces endémiques sont connues en Afrique: *Cicer curriatum* en Ethiopie et *C. atlanticum* dans le Haut Atlas au Maroc (Ameziane, 1981).

Van der Maesen et *al.* (2007) ont établi que le genre *Cicer* se compose de 45 taxons dont 9 annuels avec le pois chiche cultivé (*Cicer arietinum* L.) et 36 espèces pérennes. Actuellement, le nombre de taxons dans le genre *Cicer* a atteint 49 taxons avec les espèces pérennes suivantes :

- C. uludereensis* Donmez (Donmez, 2011),
- C. incisum* (Willd.) K. maly subsp. *serpentina*
- C. floribundum* Fenzl. var. *amanicola*
- C. heterrophyllum* var. *kassianum* (Ozturk et *al.*, 2013).

Le genre *Cicer* possède 40 espèces avec une espèce sauvage provisoire, *C. flexuosum* Lipsky, 9 espèces annuelles avec lesquelles on classe le pois chiche (*C. arietinum* : la seule espèce cultivée) et 32 espèces pérennes (Toker et al., 2014).

L'espèce *C. arietinum* n'a jamais été identifiée à l'état sauvage. Ce qui a conduit Popov (1929) in Van Der Maesen (1972) à développer la théorie selon laquelle *C. arietinum* est une espèce qui est faite « artificiellement par l'homme » et n'a jamais existé dans la nature.

Davis (1969) et Ladizinsky (1975) ont découvert deux espèces sauvages au sud-est de la Turquie et les ont dénommées respectivement *Cicer echinospernum* Davis et *Cicer reticulatum* Ladiz. Ces deux espèces ne diffèrent pas beaucoup de l'espèce cultivée *Cicer arietinum* L. et ont en commun avec celle-ci des caractères morphologiques.

Selon Ladizinsky (1989), *Cicer reticulatum* Ladiz est identifiée par des analyses de protéines et d'enzymes comme étant l'ancêtre spontané de *Cicer arietinum* L. Cette dernière espèce est donc un dérivé mutant de *C. reticulatum* Ladizinsky (Ladizinsky et Adler 1976a ; Toker, 2009).

L'étude de la parenté génétique des espèces annuelles sauvages du genre *Cicer* et de l'espèce annuelle cultivée *Cicer arietinum* L. a permis de détecter la présence d'une variabilité interspécifique remarquable et d'établir des relations phylogénétiques entre ces espèces (Dalhoumi et al., 1999).

Le pois chiche est classé comme suit:

Sous-règne	: <i>Tracheobionta</i>
Division	: <i>Magnoliophyta</i>
Classe	: <i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	: <i>Rosidae</i>
Ordre	: <i>Fabales</i>
Famille	: <i>Fabacées</i>
Espèce	: <i>Cicer arietinum</i> L. (Yadav et al., 2007, Moreno et Cubero, 1978).

1.3.2. Caractères botaniques

Le pois chiche est une plante annuelle, herbacée après émergence puis lignifiée avec l'âge. La tige est érigée, anguleuse, couverte de poils et mesure entre 30 et 50 cm de hauteur. A une certaine hauteur, selon les génotypes, la tige de pois chiche se ramifie en deux ou trois

branches, pour donner des ramifications secondaires et par la suite des ramifications tertiaires. La plante peut alors présenter un port soit étalé, soit semi dressé (Slama, 1998).

Les feuilles comprennent de 9 à 15 folioles ovales et dentelées, de 7 à 15 mm, imparipennées (pennée avec foliole terminale) avec un pétiole de 1 à 2,5 mm. Les faces inférieures sont couvertes de poils renfermant des glandes qui synthétisent des acides organiques tel que l'acide oxalique (Ladinsky et Abbo, 2015).

Les fleurs sont blanches, violettes ou bleues (Ladinsky et Abbo, 2015). Elles sont zygomorphes, typiquement papilionacées, solitaires (Duke, 1981) ou en grappes de deux insérées sur des pédoncules axillaires à l'aisselle des feuilles et au niveau des bifurcations (Benmbarek, 2011) (Fig. 4). Le pois chiche est une plante strictement autogame, l'hybridation est extrêmement rare (Cubero, 1987, Ladinsky et Abbo, 2015). Il possède 2 n à 16 chromosomes (Abbo et *al.*, 2007; Toker 2009). La plante se caractérise par une floraison massive mais le taux de nouaison est faible et varie de 28 à 37 % respectivement chez les types Kabuli et Desi (Khanna-Chopra et Sinha, 1987). La floraison, rapide durant les jours longs et lente durant les jours courts, dure de 30 à 45 jours, selon les géotypes. Toutefois, comme le pois chiche est une espèce à croissance indéterminée, sous des conditions hydriques favorables et des températures clémentes, les branches continuent à se développer, à fleurir et à produire des gousses et des graines (Leport et *al.*, 2006).

Le système racinaire est composé d'une racine principale longue robuste et pivotante qui peut atteindre un mètre de profondeur et des racines secondaires traçantes dotées de nodosités qui fixent l'azote atmosphérique (Duke, 1981; Cubero, 1987) (Fig. 4). La croissance de la plante s'arrête au démarrage de la floraison, ce qui lui permet d'explorer un grand volume de sol et lui conférer une tolérance à la sécheresse (Slama, 1998).

De forme ovale, le fruit est une petite gousse, poilue de 2 à 3,5 cm de longueur, renfermant une ou deux graines plus ou moins arrondies et terminées en pointe (Fig. 5).

L'embryon comprend deux cotylédons réunies à leurs surfaces axiales, un petit hypocotyle (axe embryonnaire) et une radicule (racine embryonnaire) située dans le «bec» de la graine. Il est entouré d'une couche (testa) qui agit comme un revêtement protecteur.

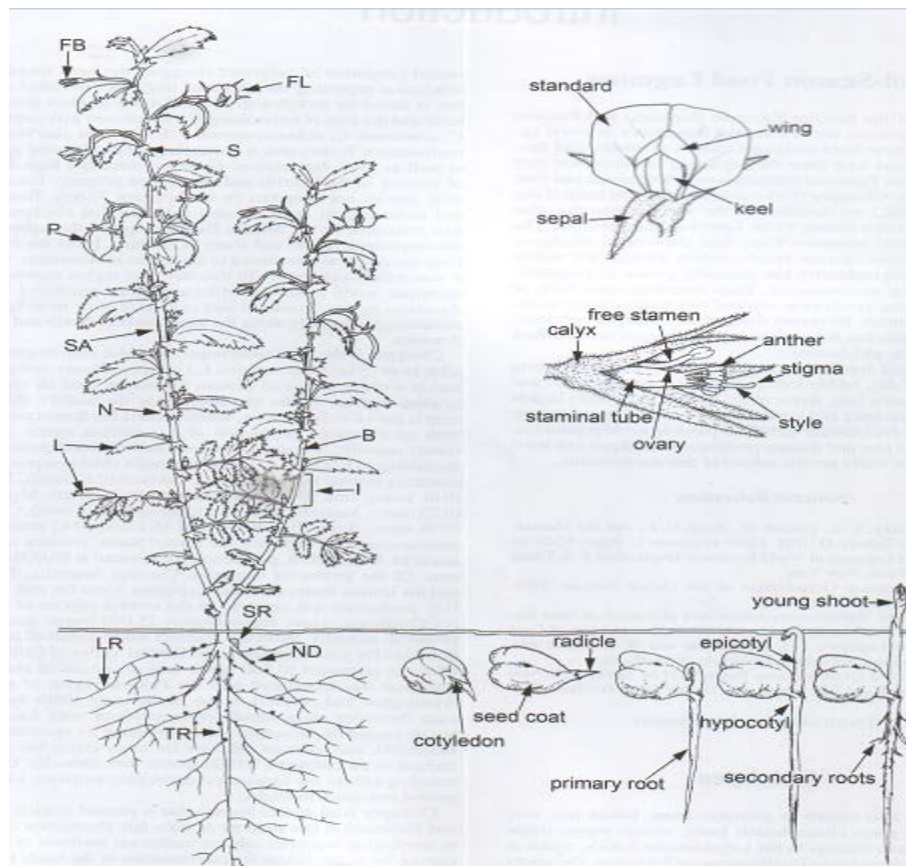


Figure 4: Caractères botaniques de *Cicer arietinum*. A gauche, plant de pois chiche: FL= Fleur ouverte; FB= Fleur; P= gousse; L= feuille (supérieure) ou folioles (inférieure); S = stipule; SA = Axe de la tige; B = branche; N = nœud; I = entrenœud; ND = nodule; SR=reste de semence; TR= racine pivotante et LR= racine latérale. En haut à droite, organes de la fleur. En bas à gauche, parties de la graine en germination (Muehlbauer, (2011) in : Compendium of Chickpea and Lentil Diseases and Pests) (œuvre de Tracy Anderson).

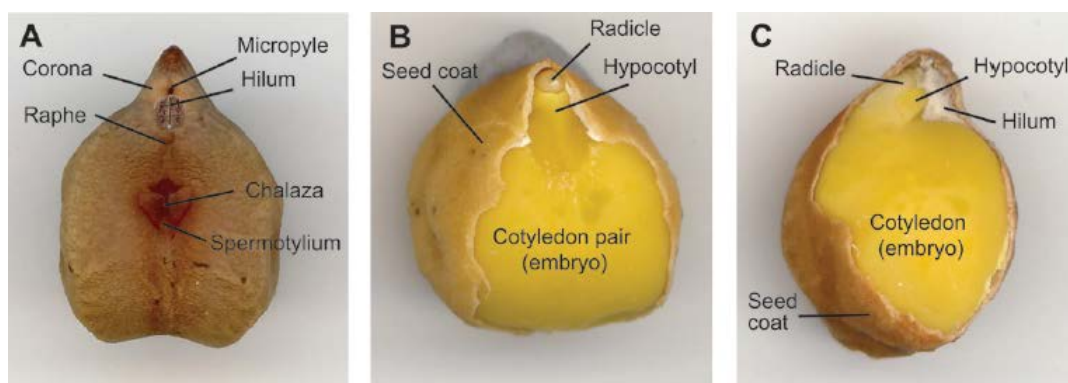


Figure 5: Graine de pois chiche (*Cicer arietinum* L.), **A**, Vue ventrale montrant des caractéristiques externes. **B**, Vue ventrale, sans revêtement de la graine, montrant des caractéristiques internes. **C**, Vue latérale, sans revêtement de semence, montrant les principales caractéristiques internes (Wood et al., 2011).

Les structures proéminentes du côté ventral sont le hile, une cicatrice funiculaire marquant le point où la graine était attachée à la gousse au cours du développement et le micropyle, un mini-pore contrôlant l'entrée d'humidité dans la graine (Wood et *al.*, 2011). Le raphé s'étend en ligne du fond de la couronne au spermatylium qui contient la chalaze (base de l'ovule).

1.3.3. Types de pois chiche

Deux types de pois chiche sont cultivés : Kabuli ou "macrosperma» et Desi ou "microsperma» (Singh, 1987; Toker, 2014) (Fig. 6). La distinction se fait sur la base de la taille et de la coloration des graines, des fleurs et des plantes. Des différences significatives existent dans l'épaisseur du tégument externe de la graine entre les types desi et kabuli. Ce dernier a une couche de graisse beaucoup plus mince (Wood et *al.*, 2011).



Figure 6: Pois chiche de type Desi, à gauche, et Kabuli à droite (http://www.icrisat.org/tropicallegumesII/pdfs/ChickpeaManual_full.pdf).

1.3.3.1. Le type Kabuli

Essentiellement cultivé et consommé dans le bassin méditerranéen, appelé aussi Garbanzo, il est caractérisé par la couleur du feuillage qui varie du vert clair au vert foncé et une floraison blanchâtre. Il a un port érigé ou semi érigé permettant la mécanisation de la récolte. La hauteur de la plante varie entre 30 et 90 cm et peut même dépasser un mètre dans un sol fertile et profond ayant une alimentation hydrique suffisante. Les graines ont une couleur claire et sont couvertes d'un tégument mince. Le type Kabuli se subdivise en deux sous-groupes :

- Le gros Kabuli dont les graines ont un diamètre de 8 à 9 mm et un poids de mille graines variant de 410 à 490 g,
- Le petit Kabuli dont les graines sont caractérisées par une forme plus régulière, un diamètre de l'ordre de 7 mm et un poids de mille graines de 265 g environ (Van Der Maesen, 1972 ; AAC, 2004).

1.3.3.2. Le type Desi

Il constitue 85 % de la production mondiale et fait partie des habitudes alimentaires de l'Inde. Il est également cultivé et consommé en Ethiopie, en Iran, au Canada, au Mexique et en Australie (Fabre, 2008). Il est caractérisé par un feuillage dont la couleur tend du vert violacé au glauque et une floraison violacée

De couleur sombre (marron clair à noire), de forme irrégulière et à surface ridée, la graine est plus petite (Benmbarek, 2011). Le port de la plante est retombant avec un aspect touffu.

Le poids de 1000 graines varie de 100 à 130 g (AAC, 2004 ; Benmbarek, 2011). Ce type est caractérisé par plus de fibres mais moins d'amidon et moins de matières grasses (Gil *et al.*, 1996).

1.4. Importance du pois chiche

1.4.1. Valeur nutritionnelle

Les légumineuses fournissent une part importante des protéines et des calories dans le régime afro-asiatique. La composition en acides aminés du pois chiche est bien équilibrée, à l'exception des acides aminés soufrés limités (méthionine et cystéine), et est riche en lysine. Le pois chiches est donc un compagnon idéal des céréales connues pour être plus riches en acides aminés soufrés mais limités en lysine (Wood et Grusak, 2007, Jukanti *et al.*, 2012).

La teneur totale en lipides comprend principalement des polyinsaturés (62-67 %), des mono-insaturés (19-26 %) et des saturés (12-14 %). Par conséquent, la petite quantité de lipides est principalement du type bénéfique (mono-insaturés et polyinsaturés) plutôt que les graisses saturées qui ont été liés aux maladies cardiaques et circulatoires.

Les glucides sont la principale composante nutritionnelle, avec 51-65% dans le type desi et 54-71 % dans le type kabuli. Les principales classes sont des monosaccharides, des disaccharides, des oligosaccharides et des polysaccharides.

Le pois chiche contient des quantités considérables d'acide folique associées à des quantités plus modestes de vitamines hydrosolubles comme la riboflavine (B2), l'acide pantothénique (B5) et la pyridoxine (B6). Ces niveaux sont similaires ou supérieurs à ceux observés dans d'autres légumineuses (Tab. 4).

Alajaji et El-Adawy (2006) montrent que l'ébullition, l'autoclavage et la cuisson à micro-ondes affectent la composition, les facteurs antinutritionnels, les facteurs de flatulence et la qualité nutritionnelle des pois chiches. Selon eux, la cuisson par micro-ondes cause de légères pertes de vitamines B et de minéraux, alors que l'autoclavage provoque des pertes importantes. Les graines de pois chiches brutes (100 g) fournissent en moyenne environ 5 mg de fer, 4,1 mg de zinc, 138 mg de magnésium et 160 mg de calcium. Environ 100 g de graines de pois chiche peuvent répondre aux besoins diététiques quotidiens en fer (1,05 mg / jour chez l'homme et 1,46 mg / j chez la femme) et en zinc (4,2 mg / j et 3,0 mg / j) alors que 200 g peuvent répondre aux besoins en magnésium (260 mg / j et 220 mg / j) (Jukanti et *al.*, 2012).

Tableau 4 : Teneur en vitamines dans différentes légumineuses (en mg/g)

Culture	Acide folique	Vit C	Vit B1	Vit B2	Vit B3	Vit B5	Vit B6	Tocopherol (Y+ α)
Pois chiche (Kabuli)	299,0	1,34	0,49	0,26	1,22	1,02	0,38	12,9
Pois chiche (Desi)	206,5	1,65	0,29	0,21	1,72	1,09	0,30	11,2
haricot	107,9	3,85	0,58	0,16	1,31	0,31	0,21	3,85
Haricots rouges	34,5	0,09	0,99	0,23	0,33	0,31	0,21	3,15
Lentilles	138,1	0,71	0,29	0,33	2,57	1,32	0,23	5,64
Haricots blancs	22,0	0,09	0,73	0,11	1,12	0,35	0,16	2,96
Pois cajan	173	NA	0,4	0,17	2,20	0,68	0,07	0,39

Vit=vitamine, les vitamines A et B12 n'ont pas été détectées dans ces légumineuses (Jukanti et *al.*, 2012).

1.4.2. Valeur médicinale

La consommation de pois chiche a des effets physiologiques qui peuvent réduire le risque de maladies chroniques et optimiser la santé. Les isoflavones sont des métabolites secondaires diphénoliques qui peuvent réduire l'incidence des maladies cardiaques (Jukanti et *al.*, 2012). Il est démontré que le régime à base de pois chiches, riche en fibres, réduit le taux total de cholestérol plasmatique chez les sujets obèses (Crujeiras et *al.* 2007).

Les oligosaccharides peuvent servir de prébiotiques (Guillon et Champ, 2002). Ces derniers stimulent la croissance et l'activité des bactéries bénéfiques dans le système gastro-intestinal, comme *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, sur des bactéries nocives comme *Salmonella spp.*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium perfringens* (Wood et Grusak, 2007).

1.4.3. Nodulation et fixation d'azote

Les cultures de légumineuses sont économiquement importantes dans les systèmes de culture en raison de leur capacité à assimiler l'azote atmosphérique. La fixation biologique de l'azote se produit à l'intérieur des nodules portés par les racines des espèces de légumineuses, à la suite d'une symbiose entre la plante hôte et les bactéries (Thavarajah et *al.*, 2005). Le sol dans lequel les légumineuses nodulées se développent contient plus d'azote nitrique (Turpin et *al.*, 2002).

1.5. Exigences écologiques du pois chiche

1.5.1. Exigences climatiques

1.5.1.1. Température

La culture de pois chiche est très vulnérable aux facteurs atmosphériques (Chaux et Foury, 1994). En effet, la température exerce une forte influence sur les phases végétatives et reproductrices de la plante (Summerfield et *al.*, 1979). La température optimale de germination des graines se situe entre 28 et 33 °C (Singh et Diwakar, 1995; Covelle et *al.*, 1986), celles-ci germent toutefois entre 10 et 45 °C (Singh et Diwakar, 1995). Selon Girrard (1985) et Verret (1982), les besoins de températures du pois chiche d'hiver varient entre 18 et 29 °C le jour et autour de 20 °C la nuit.

Le pois chiche souffre dans les environnements chauds (Lopez-Bellido et *al.*, 2004). Des températures supérieures à 32 °C limitent le rendement en grains en accélérant leur maturité (Nielson, 2001). De même, les températures élevées, entre la floraison et la maturité, se répercutent sur la réduction de la taille des graines et du rendement (Lopez-Bellido et *al.*, 2004).

1.5.1.2. Pluviométrie

Les besoins en eau du pois chiche sont limités entre 110 et 240 mm par an pour produire des rendements en grains allant de 9 à 30 qx / ha (Singh et Bushan, 1979). Cependant, comme la plupart des légumineuses à graines, le pois chiche est sensible à la sécheresse, notamment durant la floraison (Girrard, 1985). A ce stade, un déficit hydrique se traduit par une diminution du nombre de gousses, du poids de 1000 grains, et une augmentation du nombre de gousses vides (Wery, 1986).

Le pois chiche est cultivé principalement comme culture de précipitation, en hiver dans les climats subtropicaux et au printemps dans la région méditerranéenne et les climats tempérés.

1.5.1.3. Lumière

La plupart des légumineuses à graines préfèrent le soleil et réagissent à l'ensoleillement en fournissant un grand rendement. L'intensité de la lumière et la durée d'éclairement sont des facteurs importants pour la nodulation et la fixation de l'azote (Lie, 1971). Le pois chiche est une plante de jours longs, mais fleurit dans toutes les photopériodes (Smithson et al., 1985; Summerfield et al., 1979).

1.5.2. Exigences édaphiques et nutritionnelles

Le pois chiche se cultive dans différents types de sols (Bejija et Van der Maesen, 2006), mais semble préférer les sols meubles, profonds, plus ou moins argileux avec une bonne capacité de rétention (Singh et Diwakar, 1995; Moolani et Chandra, 1970 ; Saxena, 1987) ou les sols limoneux profonds qui lui fournissent des sels solubles (Moolani et Chandra, 1970). Ces sols retiennent plus de 200 mm d'eau sur une profondeur d'un mètre (Saxena, 1987).

Le pois chiche ne supporte pas les sols mal drainés qui favorisent le développement de maladies cryptogamiques (Plancquaert et Wery, 1991). Les sols très calcaires sont également à proscrire car ils donnent des graines qui cuisent mal. La culture ne supporte pas les sols salins (Bejija et Van der Maesen, 2006). Pour mieux assimiler les éléments nutritifs par les racines, le pH optimum du sol doit se situer entre 5,7 et 9 (Singh et Diwakar, 1995).

Les doses minérales recommandées incluent 20 à 30 kg d'azote et 40 à 60 kg de phosphore par hectare. Si les sols sont pauvres en potassium, une application de 17 à 25 kg/ha est recommandée. Les principaux oligoéléments dont la plante a besoin sont : le soufre (S), le zinc (Zn), le fer (Fe), le bore (B) et du molybdène (Mo) (Gaur et al., 2010).

1.6. Les principales maladies affectant la culture de pois chiche

Le pois chiche est sujet à de nombreuses maladies. Nene et al. (1996) ont recensé 172 agents pathogènes dont 67 champignons, 22 virus, 3 bactéries, 80 nématodes et mycoplasmes ((Tab. 5, 6 et 7).

L'impact de chaque maladie sur les rendements diffère selon les régions du globe. La fusariose (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*), la pourriture sèche des racines (*Rhizoctonia bataticola*) et la pourriture du collet (*Sclerotium rolfsii*) sont les plus importantes maladies racinaires dans les régions du sud et de l'est de l'Asie ainsi que de l'Afrique de l'est. Dans le cas des maladies foliaires, l'anthracnose (*Ascochyta rabiei*) et la moisissure grise (*Botrytis*

Partie I : Revue bibliographique

cineria), elles sont importantes en Asie centrale, l'Afrique du nord, l'Amérique du nord, l'Australie, le nord de l'Inde et le Pakistan.

Tableau 5 : Principales maladies fongiques du pois chiche dans le monde.

Maladies	Agents responsables	Références
Anthraxose	<i>Ascochyta rabiei</i>	Akem (1999); Haware et al. (1986) ; Bayaa et Chen (2011); Sharma et Ghosh (2016).
Phoma « blight »	<i>Phoma medicaginis</i>	Haware et Nene (1981); Nene et al. (1991); Nene et al. (2012).
Alternariose	<i>Alternaria alternata</i> (syn. <i>A. tenuis</i> Nees)	Bhargava (1988); Bhargava (1995); Nene et al. (2012).
Rouille	<i>Uromyces ciceris</i>	Khouader et al. (2013) ; Stuteville et al. (2010) ; Nene et al. (1991).
Sclerotiniose	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Sclerotinia minor</i> <i>Sclerotinia trifoliorum</i>	Sharma et al. (1999); Chen et al. (2006); Njambere et al. (2007); Nene et al. (1991).
Mildiou	<i>Perenospora ciceris</i>	Agarwal et al. (2003).
Oidium	<i>Leveillula taurica</i> (Lév.)	Attanayake et al. (2008) ; Nene et al. (2012);
Pourriture grise	<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	Agarwal et al. (1999) ; Pande et al. (2006) ; Pande et al. (2010) ; Haware et al. (1992) ; Hosen et al. (2010) ; Nene et al. (1991).
Flétrissement vasculaire	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i>	Sharma et Muehlbauer (2007) ; Nene et al. (2012) ; Jimenez-Diaz et al., (2015) ; Belabid et Fortas (2011); Maitlo et al. (2016).
Pourriture noire des racines	<i>Fusarium solani</i>	Cherif et al. (2007) ; Nene et al. (2012) ;
Fonte de semis	<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.	Kaiser et Hannan (1983); Nene et al. (2012).
Pourriture racinaire	<i>Phytophthora megasperma</i> f. sp. <i>medicaginis</i>	Du et al. (2013). Intizar-ul-Hassan et al. (2012).
Fonte de semis	<i>Pythium debaryanum</i> <i>Pythium irregulare</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Pythium</i> spp.	Trapero-Casas et al. (1990); Nene et al. (2012).
Verticilliose	<i>Verticillium albo-atrum</i> <i>Verticillium dahliae</i>	Bhatti et al. (1983); Nene et al. (2012).
Complexe de flétrissement	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Verticillium albo-atrum</i> <i>Rhizoctonia bataticola</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Trapero-casas et Jimenez-Diaz (1985); Pande et al. (2007) ; Nene et al. (2012) ; Omri Ben Youssef et al. (2010). Benfreha et al. (2014) ;
Pourriture humide des racines	<i>Rhizoctonia solani</i>	Nene et al. (1991); Omri et al. (2010). Nene et al. (2012).
Pourriture sèche	<i>Rhizoctonia bataticola</i>	Nene et al. (1991); Nene et al. (2012). Ganeshamoorthi et Dubey (2015).

Tableau 6 : Principales maladies virales affectant le pois chiche

Symptômes	Agent causal	Distribution	Importance
Mosaïque jaune Jaunissement	<i>Bean yellow mosaic potyvirus</i> (BMYV)	USA, Iran, Inde	Importance locale, pertes de rendement estimées à 77-92 % en Iran.
Mosaïque jaune	<i>Beet western yellow luteovirus</i> (BWYV)	Australie, Inde, Espagne, Syrie	Mineure
Mosaïque, nécroses, flétrissements	<i>Alfaalfa mosaic virus</i> (AMV)	Largement répandu	Localement important en Iran où les pertes de rendement sont estimées à 52%.
Enation, mosaïques	<i>Pea enation mosaic virus</i> (PEMV)	USA, Italie	Mineure ?
Necrotic yellows	<i>Lettuce necrotic yellows Rhabdovirus</i> (NLYV)	Australie	Potentiellement à la Nouvelle-Galles du Sud et au sud de la Queensland.
Enroulement des feuilles, jaunissement et nanisme	<i>Faba bean necrotic yellow virus</i> (FBNYV)	Pays de l'Afrique du Nord, Sud de l'Europe et Sud de l'Asie.	Large distribution
Jaunissement, rougissement du feuillage, et brunissement du phloème	Masterevirus: <i>Chickpea chlorotic dwarf virus</i> (CpCDV)	Inde, Ouest de l'Asie, Afrique du Nord	Large distribution en Inde même sur les espèces sauvages du genre <i>Cicer</i> spp.
Nécroses et dégénérescence du phloème	Luteovirus: <i>Bean leafroll virus</i> (BLRV)	Iran, Californie, Afrique subsaharienne ;	Distribution moyenne.
Symptômes légers de mosaïque	Pea seed borne mosaic virus (PSbMV)	Algérie ; Australie ; Egypte, Ethiopie ; Iran, Jordanie, Maroc, Nouvelle Zéland, Tunisie, Turquie, USA.	Large distribution mondiale à cause des échanges de semences.

Source : ICRISAT (1990) ; Nene et al., (2012) ; Schwinghamer et Larsen (2011).

Tableau 7 : Principales maladies bactériennes affectant le pois chiche

Symptômes	Agent causal	Distribution	Importance
Brûlure bactérienne et fonte de semis	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cassiae</i> (Kulkarni, Patel & Dhande) Dye.	Inde	Mineure ?
Chancres bactériens de la tige, taches foliaires et dépérissement	<i>Pseudomonas andropogonis</i> (Smith) Stapp.	Australie, Italie, une signalisation aux USA.	Mineure ?
Graines roses	<i>Erwinia rhapontici</i>	Canada	Faible incidence

Source : Nene et al. (1996); Shroeder (2011).

Chapitre II

L'anthracnose du pois chiche

2.1. Répartition géographique et importance économique de la maladie

L'anthracnose, causée par *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., est la maladie aérienne la plus importante (Singh et Reddy, 1990). Elle a été signalée dans tous les pays producteurs de pois chiche, dans les zones à humidité élevée et à pluviométrie supérieure ou égale à 150 mm et des températures comprises entre 15 et 20 °C (Jan et Weisse, 1991). Ces pays se situent à l'ouest de l'Asie, en Afrique du Nord, au sud-est de l'Europe et dans la région Nord de l'Inde et du Pakistan (Singh et Reddy, 1990), aux Etats-Unis (Guzman et al., 1995) et en Australie (Khan et al., 1999). Récemment elle a été déclarée en Chine (Bai et al., 2011 ; Sun et Zhu, 2016) puis pour la première fois en Argentine (Viotti et al., 2012).

Les pertes occasionnées par ce pathogène (Tab. 8) diffèrent d'un pays à un autre. Dans certaines conditions favorables, elles peuvent atteindre 100 % (Singh et Reddy, 1990). Plusieurs rapports évaluent les dégâts provoqués par la maladie dans différents pays à plusieurs millions de dollars. Au Maroc par exemple, pour les années 1979 et 1980, les dégâts sont estimés à 10 millions de dollars (Labdi, 1990).

Tableau 8: Pertes de rendement de pois chiche causées par *Ascochyta rabiei* et observées dans différents pays (Nene et Reddy, 1987).

Pays	Années	Pertes (%)	Références
Bulgarie	1936	20-50	Kovachevski (1936)
Ex USSR	1956	100	ICARDA (1983)
Grèce	1957-1958	10-20	Demeterides et al., (1959).
Maroc	1971	2-40	Kamal (1984)
	1920-1930	50	Luthra et al. (1935)
	1936	20-50	Sattar (1933)
Pakistan	1978-1979	17	Malik et Tufaïl (1984)
	1979-1980	48	Malik et Tufaïl (1984)
	1980-1981	Jusqu'à 15	Aslam (1984)
	1981-1982	42	Quereshi (1984a)
Espagne	Après - guerre	20-100	Cubero (1984)
	1981	5-30	El mott (1984)
Syrie	1982	30	ICARDA (1982)
Tunisie	1981	40	Mtaïki et Hamdi (1984)

Source : Nene et Reddy, 1987

2.2. Taxonomie et reproduction de l'agent pathogène

2.2.1. Taxonomie et caractéristiques de *Ascochyta rabiei*

La forme asexuée de l'agent de l'antracnose a été identifiée en premier. Selon Corbaz (1956), c'est Labrousse, en 1931, qui le premier, donna le nom de *Phyllosticta rabiei* à ce champignon. Ces observations relèvent une proportion de 2-4 % spores bicellulaires. Labrousse mentionne que «Les différences systématiques entre les genres *Phyllosticta* et *Ascochyta* sont si artificielles que la position d'une espèce dans l'un ou l'autre genre est une question d'appréciation personnelle».

Agrios (1988) proposa la classification suivante:

- Subdivision : *Deuteromycotina*
- Classe : *Coelomycetes*
- Ordre : *Sphaeropsidales*
- Genre : *Ascochyta*
- Espèce : *Ascochyta rabiei*

Kovachevski découvrit en Bulgarie, en 1936, la forme sexuée (téléomorphe) sur des débris de cultures et attribue à celle-ci le nom de *Didymella rabiei* (syn. *Mycosphaerella rabiei* Kovachevski). Il l'inclut dans la subdivision des *Ascomycotina*, la classe des *Loculoascomycètes* et l'ordre des *Dothidéales*.

Plus tard, d'autres travaux rapportèrent l'existence du téléomorphe en URSS (Gorlenko et Bushkova, 1958), en Grèce (Zachos et *al.*, 1963), en Espagne (Trapero-casas et Kaiser, 1992 b ; Navas-Cortés et *al.*, 1995), aux Etats-Unis (Kaiser, 1981 ; Kaiser et Hannan, 1987 b ; Trapero-casas et kaiser, 1992 b), en France (Ameziane, 1985 ; Kaiser et Hannan, 1987 b), en Turquie (Kaiser et Kusmenoglu, 1997), au Canada (Armstrong et *al.*, 2001), en Australie (Galloway et MacLeod, 2003) et récemment en Tunisie (Rhaiem et *al.*, 2006).

La forme parfaite *Didymella rabiei* a également été observée sur des débris de culture en Algérie (Kaiser, 1997).

D'un point de vue systématique, Agrios (1988) rattacha la forme parfaite à:

- Classe : *Ascomycètes*
- Sous-classe : *Loculoascomycètes*
- Ordre : *Sphaeriales*
- Famille : *Sphaeriaceés*
- Genre : *Didymella* (*Mycosphaerella*)
- Espèce : *Didymella rabiei*

Plus récemment, la forme parfaite est rattachée à :

- Règne : *Fungi*
- Phylum : *Ascocmycota*
- Sous-phylum : *Pezizomycotina*
- Classe : *Dothideomycetes*
- Sous-classe : *Pleosporomycetidae*
- Ordre : *Pleosporales*
- Famille : *Didymellaceae*
- Genre : *Didymella*
- Espèce : *Didymella rabiei* (Kovatsch.).

Source : <https://gd.eppo.int/taxon/mycora> (page consultée le 10 décembre 2016)

2.2.2. La reproduction

2.2.2.1. La reproduction sexuée

La reproduction sexuée, dite « parfaite » se distingue par la production de pseudothèces se développant sur des substrats naturels (tiges de pois chiches ou de débris de récolte). De couleur brun noirâtre à noir, les pseudothèces sont subglobuleuses et mesurent entre 120 et 270 µm de diamètre. Elles renferment des asques cylindriques, bituniqués, portant chacune 8 ascospores hyalines. Chaque ascospore, de forme ovoïde, est divisée en deux cellules inégales, et mesure 9.5-16 x 4.5-7 µm (Traperos-Casas et Kaiser, 1992) (Fig. 7).

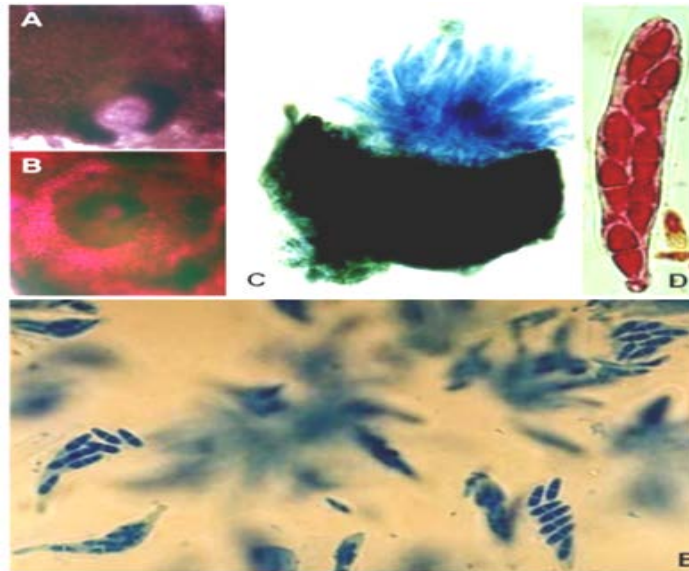


Figure 7 : Fructifications sexuelles de *Didymella rabiei*

A-B, pseudothèces avec bec et ostiole (x 400); **C**, pseudothèce avec asques (x 400); **D**, asque avec ascospores (x 1000); **E**, asque en forme de moufles (x 400) (Rhaïem et Chérif, 2006).

A. rabiei est hétérothallique, cependant les deux mating types (Mat1-1 et Mat1-2) ne sont pas présents dans toutes les régions de culture de pois chiche (Khan et al., 1999b). La présence du téléomorphe (*Dydimella rabiei*) dans le cycle de *A. rabiei* contribue à la

variabilité des populations du pathogène, ce qui peut générer de nouvelles combinaisons de gènes de virulence et ainsi créer de nouveaux pathotypes (Pande et *al.*, 2005).

2.2.2.2. La reproduction asexuée

La reproduction asexuée, dite « imparfaite » ou végétative, caractéristique de l'anamorphe, se distingue par la production de pycnides en forme de poires, de couleur marron foncé à noir. Les pycnidiospores sont ovales à oblongues, droites ou légèrement incurvées à l'une ou aux deux extrémités et mesurent 6-12 x 4-6 μm (Nene, 1982) (Fig 8).

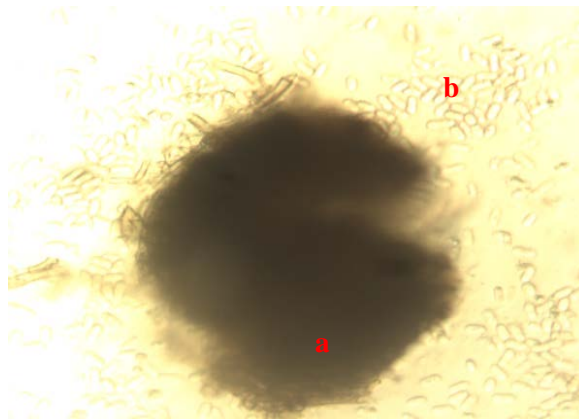


Figure 8: Pycnides (a) et pycnidiospores (b) de *Ascochyta rabiei* (x400) (Originale, 2015)

2.3. Symptomatologie de la maladie

Au champ, l'antracnose apparaît d'abord sous forme de petites plages visibles de loin. Dans des conditions de températures et de précipitations favorables, la maladie peut se propager rapidement et affecter sévèrement toutes les plantes (Fig. 9).



Figure 9: Dégâts de l'antracnose de pois chiche à Aïn Temouchent (juin 2013).

L'agent pathogène, responsable de l'antracnose, provoque des lésions sur toutes les parties aériennes de la plante (les feuilles, les pétioles, les fleurs, les gousses, les branches et les tiges) (Sharma et Ghosh, 2016). Sur feuilles, les lésions (Fig. 10A) se présentent sous forme de taches rondes avec des marges brun foncé et un centre gris clair portant des pycnides de couleur gris foncé ou brun foncé. Les folioles atteintes jaunissent et finissent par tomber (Bayaa et Chen, 2011). Sur les tiges et les pétioles, les lésions s'allongent et deviennent ovales, souvent avec des pycnides disposées en cercles concentriques (Fig. 10B).



Figure 10: Lésions nécrotiques causées par *Ascochyta rabiei* : (A), sur folioles de pois chiche, (B) sur tiges et gousses. (Originale, 2012).

Les tiges se cassent habituellement au niveau des nécroses annulaires. La partie de la tige située au-dessus de la nécrose, flétrit, jaunit et se dessèche (Nene, 1982). Les lésions sur les gousses sont généralement rondes et contiennent des pycnides disposées en cercles concentriques (Fig. 11A). Le champignon pénètre dans la gousse et infecte la graine en développement. Les gousses produisent souvent des graines ratatinées et ne parviennent pas à développer une semence viable (Kaiser, 1972 ; Bayaa et Chen, 2011).

Le champignon se présente sous forme de mycélium dans toutes les parties de la graine. Les spores se trouvent souvent à la surface de la graine, alors que les pycnides sont localisées dans les téguments (Champion, 1997). L'infection des semences provoque une décoloration de la graine et parfois des chancres profonds de forme ronde ou irrégulière sur celles-ci (Fig. 11B). Les plantules, émergeant à partir de graines infectées, montrent des lésions brunes à la base de la tige, 7 à 10 jours après la germination des graines (Bayaa et Chen, 2011).



Figure 11: Symptômes d'antracnose sur gousse et graines : (A), pycnides sur gousse disposées en anneaux concentriques, (B), aspect des graines de pois chiche infectées (Bayaa et Chen, 2011).

2.4. Biologie et épidémiologie du pathogène

2.4.1. Survie du pathogène

Le champignon se conserve sous deux formes au niveau des semences et des débris de cultures: mycélium et / ou organes de reproduction (Kaiser, 1973). Entre 10 et 35 °C, *A. rabiei* peut survivre jusqu'à 20 mois sur des tiges de pois chiche infectées (Kaiser et Hanan, 1987), jusqu'à 5 mois sur la surface des graines infectées (Singh et *al.*, 1995).

Le stade téléomorphe assure la longue survie du pathogène mais n'est jamais observé sur des plantes récemment infectées (Pande et *al.*, 2005). Les températures basses et les humidités élevées sont nécessaires à l'initiation et au développement des pseudothèces.

A. rabiei peut être hébergée par certaines espèces spontanées telles que *Brassica nigra* (Moutarde noire), *Descurania sophia* (herbe sophia), *Galium aparine* (Gaillet gratteron), *Lamium amplexicaule* (Lamier) et *Triticum aestivum* (blé) (Bayaa et Chen, 2011).

Les débris de récolte contribuent à conserver ce parasite en vie sous forme de pycnides et de périthèces. C'est pourquoi la culture de pois chiche ne doit pas revenir sur la même parcelle pendant au moins deux années (Zachos et *al.*, 1963). Le champignon peut survivre au-delà de deux ans dans les semences infectées et se conserver même à une température dépassant 45 °C (Kaiser, 1972). Sattar (1933) rapporte qu'entre 25 et 30 °C, 50 % des spores présentes dans la graine survivent pendant 5 mois, alors qu'à 35 °C, seulement 5 % peuvent survivre pendant la même durée.

2.4.2. Epidémiologie du pathogène

Les contaminations primaires proviennent de trois principales sources : des graines contaminées, des résidus de cultures et de cultures voisines contaminées (Kaiser, 1973). Le champignon hivernant sous sa forme parfaite sur les chaumes de pois chiche infectés constitue une source d'inoculum primaire (Luthra et *al.*, 1935 ; Navas-Cortes et *al.*, 1995) (Fig. 12).

Les graines infectées produisent des plantes infectées qui pourront servir comme source d'inoculum secondaire, toutefois pour *Ascochyta rabiei*, le contact entre les lésions du tégument ou des cotylédons et la plante émergente est nécessaire pour la transmission de l'agent pathogène. Dans ces lésions, le champignon sporule abondamment, produit des pycnides contenant des conidies qui peuvent être disséminées par les éclaboussures de pluie (Bayaa et Chen, 2011).

La libération d'ascospores viables à partir de périthèces commence durant l'automne-hiver, et cesse après 8 semaines si les tissus infectés sont maintenus à la surface du sol (Kaiser et Hanan, 1987). Les ascospores libérées sont disséminées par le vent et constituent l'inoculum primaire (Trapero-Casas et Kaiser, 1987; Armstrong *et al.*, 2001) (Fig. 12).

Les travaux de Trapero-Casas et Kaiser (1992), aux Etats Unis, montrent que dans des conditions naturelles au champ, le développement de pseudothèces commence au cours de l'automne et de l'hiver. Les ascospores sont libérées dans l'air dès la fin de la saison hivernale, jusqu'à la fin de la saison de printemps. Le nombre d'ascospores par unité de surface de tissu de résidus de pois chiches fortement infestés est d'environ 15.000 par mm².

En absence du vent et par temps sec, la dissémination des pycnidiospores se fait par contact, d'où la propagation circulaire de la maladie autour des premiers plants contaminés (Zacho et *al.*, 1963). Lorsque les températures sont comprises entre 15 et 25 °C, 95 % des ascospores et les pycnidiospores germent au bout de 6 à 7 heures. Alors qu'à 0 ou 35 °C, la germination n'a pas lieu (Trapero-Casas et Kaiser, 2007). Les températures, autour de 10 °C la nuit et autour de 20 °C le jour, accompagnées d'un temps nuageux, favorisent la propagation de la maladie. La maturation des pseudothèces a lieu entre 5 et 10 °C (Nene et *al.*, 1991). Les épidémies sont favorisées par une durée d'incubation courte, des températures assez élevées du printemps et des pluies fréquentes de la fin de l'hiver jusqu'au début du printemps, ce qui entraîne un développement conséquent de la maladie (Zachos et *al.*, 1963).

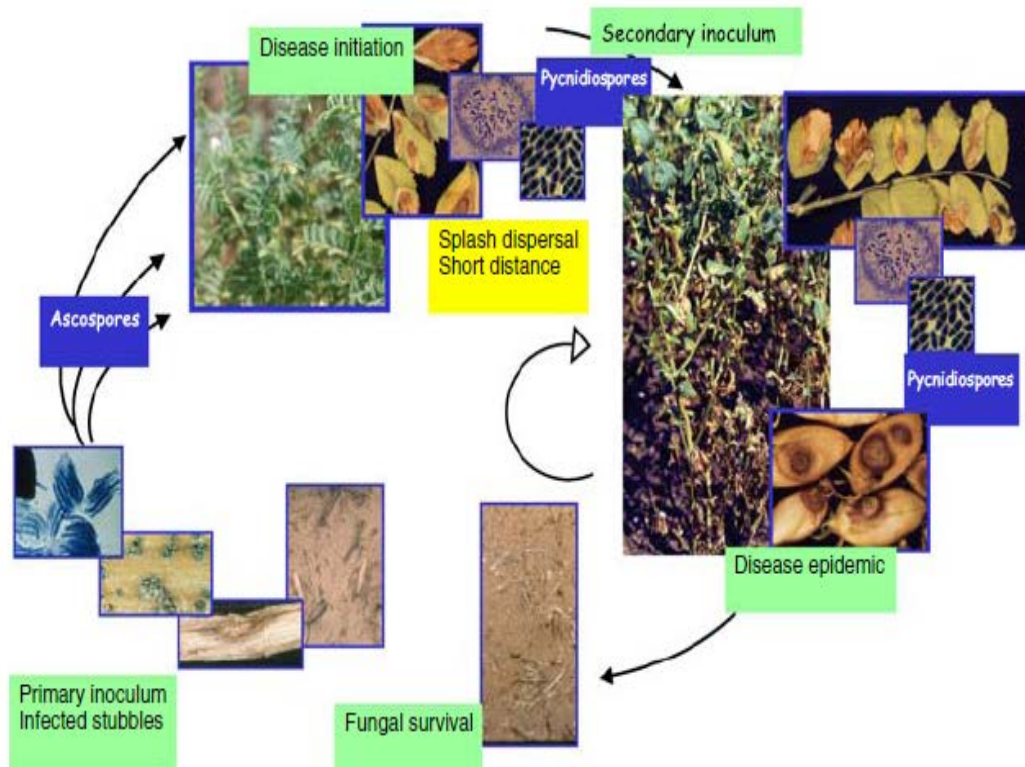


Figure 12 : Cycle épidémique de l'antracnose du pois chiche (Tivoli et Banniza, 2007).

La gravité de cette dernière est affectée par la durée d'humectation de la feuille (Shtienberg et *al.*, 2006), une durée d'environ 17 heures peut produire une grave infection (Pande et *al.*, 2005) qui est fortement réduite lors des périodes sèches. Une durée de 2, 4 ou 6 heures d'humectation des feuilles suffit pour initier l'infection (Armstrong-Cho et *al.* 2004).

2.5. Pathogénicité

2.5.1. Histopathologie

La pénétration à l'intérieur du tissu de l'hôte se fait à travers la cuticule des folioles et des tiges, et par les ouvertures naturelles (stomates, lenticelles) en seulement 24 heures après l'inoculation (Pandey et *al.*, 1987). Le champignon infecte la plante par pénétration directe de l'épiderme, après la formation de structures d'infection appelées appressoriums (Höhl et *al.*, 1990; Köhler et *al.*, 1995).

En contact avec les tissus de l'hôte, les conidies germent après 12 heures (Pandey et *al.*, 1987). Après la pénétration, les hyphes se développent simultanément entre les cellules épidermiques et les cellules du parenchyme palissadique, désintégrant la structure interne des feuilles (Pande et *al.* 2005). La pénétration de la cuticule se fait non seulement par voie

mécanique, mais aussi par l'action des enzymes hydrolytiques car les appressoriums ne sont pas mélanisés (Tenhaken, 1992). Le champignon se propage sous l'épiderme, principalement dans l'espace intercellulaire, envahissant les cellules et provoquant un effondrement rapide des tissus des feuilles par plasmolyse. Une fois les folioles infectées, le champignon s'installe dans la tige en passant par les vaisseaux des pétioles (Tenhaken, 1992). Les hyphes s'agrègent et forment des pycnides qui émergent à l'extérieur à partir des tissus infectés et effondrés (Pande et *al.*, 2005). Au septième jour, la plupart des cellules non lignifiées sont détruites (Pandey et *al.*, 1987; Pande et *al.*, 2005 ; ILarslan et Dolar, 2002).

2.5.2. Les pathotoxines et les enzymes impliquées dans l'infection

Des toxines appelées solanapyrones A, B et C sont impliquées dans la pathogénicité de *A. rabiei* (Alam et *al.*, 1989). Latif et *al.* (1993) signalent une substance toxique appelée Cytochalasine D.

A. rabiei secrète aussi une phytotoxine de nature protéique composée de 14 acides aminés et ayant un poids de 7,6 kDa (Chen et Strange, 1994 ; Jayakumar, 2005). Selon Kaur (1995), il existerait une forte corrélation entre la production *in vitro* de solanapyrones par différents isolats et leur pathogénicité. D'autre part, des analyses fonctionnelles du gène de Diels-alderase *Sol5* de *Ascochyta rabiei* indiquent que les solanapyrones ne sont pas requises pour la pathogénicité (Kim et *al.*, 2015).

2.5.3. Variabilité du pouvoir pathogène

En général, la variabilité du pouvoir pathogène peut s'exprimer sur les deux composantes du pouvoir pathogène : virulence et agressivité (Belabid et Fortas, 2011). La virulence caractérise la capacité d'un biotype (ou pathovar) à surmonter la résistance verticale d'une variété (Lepoivre, 2003), par contre, l'agressivité exprime le pouvoir pathogène d'un parasite défini par rapport à la résistance horizontale des variétés de l'hôte.

Le constat que les nouvelles variétés peuvent perdre leur résistance peu d'années après leur installation dans certaines régions ont conduit les chercheurs à s'interroger sur la variabilité du pouvoir pathogène chez *Ascochyta rabiei*.

Le terme pathotype été utilisé récemment pour décrire les niveaux d'agressivité des isolats avec un petit ensemble de génotypes différentiels (Udupa et *al.*, 1998; Jamil et *al.*,

2000; Chen et *al.*, 2004). Trois pathotypes ont été identifiés (Udupa et Weigand, 1997; Chen et *al.*, 2004 ; Benzohra et *al.*, 2015).

Plusieurs auteurs confirment la présence d'un nouveau pathotype très agressif, désigné comme étant le pathotype IV, capable de surmonter la résistance des lignées ICC-12004 et ICC-3996 (Imtiaz, 2011).

2.6. Le polymorphisme génomique

L'analyse de la variation génétique des populations du pathogène est une condition préalable importante pour comprendre la co-évolution des pathosystèmes des plantes (Sarwar et *al.* 2013).

2.6.1. Polymorphisme de séquence

La séquence est la seule méthode exhaustive de recherche de polymorphisme dans un fragment d'ADN. L'utilisation en routine de cette technique reste peu développée, à cause du nombre de loci et des grands effectifs généralement nécessaires dans les études de génétique (Tagu et Moussard, 2003).

La technique RADP, décrite par William et *al.* (1990), est largement utilisée pour l'identification ou la différenciation des souches d'agents pathogènes telles que *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (Belabid et Fortas, 2011 ; Ali et *al.* 2012 a), *Ascochyta rabiei* (Udupa et *al.*, 1998 ; Jamil et *al.*, 2010).

Ces techniques moléculaires sont utilisées dans plusieurs investigations pour l'étude de la diversité génétique de *A. rabiei*, de la relation entre les marqueurs moléculaires et pathotypes et des relations phylogénétiques (Jamil et *al.*, 2000; Navas-Cortès et *al.*, 1998 ; Khan et *al.*, 1999; Santra et *al.*, 2001).

Les marqueurs moléculaires couramment utilisés pour évaluer la variation génétique de *A. rabiei* sont basés sur la technique RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction). Cette technique repose sur la comparaison des profils de fragments obtenus par les enzymes de restriction suite à l'existence d'un polymorphisme dans la séquence d'une molécule d'ADN par rapport à une autre. Des mutations apparaissant sur une séquence d'ADN reconnue par une enzyme de restriction provoquent des longueurs de fragments de restriction différentes. Les produits de restriction sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide ou d'agarose en présence d'un marqueur de poids moléculaire (Tagu et Moussard, 2003).

2.6.2. Polymorphisme de nombre d'unités de répétition

Les microsatellites (SSR) sont constitués de répétition en tandem de motifs mono, di-, tri- ou tétranucléotidiques (Tagu et Moussard, 2003). Plusieurs chercheurs utilisent les marqueurs microsatellites pour détecter des variations génétiques parmi les isolats de *A. rabiei* (Bayraktar, 2007; Nourollahi et al., 2011 ; Ali et al., 2012). La technique PCR est utilisée pour révéler les loci microsatellites qui sont des marqueurs codominants et multialléliques.

2.7. Méthodes de lutte contre l'antracnose

2.7.1. Lutte culturale

Les pratiques culturales, visant à la protection intégrée des cultures, peuvent agir sur l'ensemble du cycle de l'agent pathogène et ainsi participer à un système de protection durable (Meynard et al., 2003). Selon ces derniers, les systèmes de culture ont un effet sur :

- la taille de l'inoculum primaire et sa localisation,
- le développement et la localisation de l'épidémie,
- la coordination des cycles biologiques des plantes et de leurs agents pathogènes,
- l'équilibre écologique

Une rotation triennale est aussi recommandée car l'inoculum présent sur les débris de pois chiche peut survivre plus de 12 mois (Bayaa et Chen, 2011).

L'enfouissement des résidus de culture après la récolte contribue à l'accélération de la décomposition des débris des plantes nécrosées et entraîne par conséquent une baisse de la viabilité des propagules du pathogène (Nene et Reddy, 1987). Inversement, lorsque les conditions météorologiques sont extrêmes (températures inférieures à -30 °C), cette technique peut aider à préserver les débris, ainsi l'inoculum peut devenir disponible à nouveau lors du semis, lorsque les débris sont entraînés à la surface du sol.

D'autres pratiques culturales consistent à semer profondément les graines (de sorte que les graines infectées soient incapables de sortir du sol), à espacer les rangs et à réduire la densité de semis (100-120 kg/ha au lieu de 180 kg/ha), de façon à éviter une densité végétale élevée, propice à une humidité excessive dans le couvert (Bayaa et Chen, 2011).

On peut envisager la destruction des foyers primaires de l'infection et le buttage des plantes (Kaiser, 1973 ; Nene, 1984) et de pratiquer une rotation culturale, particulièrement avec le blé, pour contribuer à la destruction de l'inoculum primaire (Kaiser, 1981).

2.7.2. Lutte chimique

Le traitement des semences avec des fongicides systémiques (azoxystrobine) peut aussi aider à protéger les jeunes plantes des infections foliaires par *A. rabiei* (Bayaa et Chen, 2011) ou bien avec des formulations tels que le métalaxyl, le captan, le thiabendazole et le benomyl (Wise et *al.*, 2011).

Les fongicides foliaires réduisent efficacement l'infection en retardant le développement secondaire de celle-ci, réduisant ainsi la propagation de la maladie. En raison de la nature polycyclique de la maladie et de la sensibilité de l'hôte durant tout le cycle de la culture, l'application de fongicides en temps opportun est nécessaire (Chongo et *al.*, 2003; Bayaa et Chen, 2011).

Le développement de la résistance à la suite d'applications répétées d'un fongicide, les effets aigus et chroniques sur l'Homme et la faune, et la pollution de l'environnement sont les principaux problèmes rencontrés en lutte chimique (Lopez-Fernandez et *al.*, 2012; Campbell et *al.*, 2012).

2.7.3. Lutte biologique

La lutte biologique est l'utilisation d'un ensemble de méthodes visant à détruire les micro-organismes nuisibles aux plantes cultivées par l'emploi judicieux de leurs ennemis naturels tels que les bactéries, les champignons, les virus et les nématodes.

La protection conférée par un agent biologique peut être basée sur un ou plusieurs mécanismes d'action : la compétition pour les éléments nutritifs ou l'espace, le parasitisme, la production de substances toxiques pour le pathogène (antibiose) et/ou la stimulation des défenses naturelles de la plante (Yedidia et *al.*, 1999 ; Haas et *al.*, 2000). Les travaux de Wang et *al.* (2003) ont montré que le champignon *Trichoderma viride* influence le développement et la survie de *A. rabiei*. Dans des essais en laboratoire, Dugan et *al.* (2005) ont trouvé que *A. rabiei* et son téléomorphe (*Didymella rabiei*) sont inhibées en présence de champignons tels que *Aureobasidium pullulans* et *Clonostachys rosea*.

2.7.4. Lutte génétique

La sélection et les semis de cultivars hautement résistants sont les moyens les plus économiques et l'une des pratiques les plus importantes dans le contrôle de l'antracnose (Singh et *al.*, 1981 ; Singh et Reddy, 1991). Bien qu'aucun génotype de pois chiche n'ait une

immunité complète à l'antracnose, certains cultivars présentent toutefois un haut degré de résistance ou de tolérance à la maladie.

Les centres de l'ICARDA et l'ICRISAT développent un programme de recherche sur la création d'un matériel végétal résistant. Plusieurs variétés sont déjà mises au point (Nene et *al.*, 1981; Singh et Reddy, 1989). Les essais au champ, réalisés en Inde durant 12 années (Kaur et *al.*, 2012), montrent que les lignées 'ILC200' et 'ILC 3279' sont résistantes ; en contradiction avec les travaux de Iqbal et *al.* (2010) qui mentionnent que l'ILC 3279 n'est pas hautement résistante. En Algérie, Djaoui (1985) montre que les variétés locales (Ain Timouchent, Oran, Sebdou) sont très sensibles à tous les isolats de *Ascochyta rabiei*.

Les travaux s'orientent actuellement vers les espèces sauvages. A partir d'un croisement de *Cicer judaicum* et de *C. pinnatifidum*, Singh et Reddy (1993) ont obtenu une accession résistante au champ et même en serre. Collard et *al.* (2001) notent que certaines accessions de *C. bijugum*, *C. echinospermum* et *C. pinnatifidum* sont résistantes. Shah et *al.* (2005) ont enregistré la résistance de 14 accessions de *C. bijugum*, 1 de *C. echinospermum*, 12 de *C. judaicum*, 15 de *C. pinnatifidum*, 1 de *C. reticulatum*, et 3 de *C. yamashitae*.

La résistance à *A. rabiei* serait gouvernée par un seul gène dominant (Haafiz et Achraf, 1953 ; Vir et *al.*, 1975; Singh et Reddy, 1983; Iqbal et *al.*, 2004). Pour Labdi (1995) cette résistance est rarement monogénique et serait le plus souvent sous le contrôle de plusieurs gènes avec des effets d'interaction inter-alléliques diverses.

La plupart des programmes de sélection dans le monde se sont fortement appuyés sur deux génotypes de type Kabuli, ILC72 et ILC3279, en tant que sources de résistance contre l'antracnose (Muehlbauer et *al.*, 1998 a; Muehlbauer and Kaiser, 2002; Rubio et *al.*, 2004).

Des marqueurs moléculaires liés à deux QTL majeurs et un QTL mineur conférant la résistance à l'antracnose sont identifiés en utilisant des lignées recombinantes issues de croisements interspécifiques comme *C. arietinum* x *C. reticulatum* (Ali et *al.*, 2011). Les QTL analysés permettant d'identifier des marqueurs moléculaires pourraient être utilisés pour évaluer la diversité des régions génomiques spécifiques à l'antracnose et pour mesurer les relations génétiques entre génotypes (Hamwiah et *al.*, 2013).

Chapitre III

***Medicago truncatula* Gaertn**

3.1. Historique

Medicago truncatula est l'espèce annuelle la plus importante de *Medicago*, la seconde en importance agricole après la plante pérenne *Medicago sativa*. Il y a plus de cultivars de cette espèce que de toute autre espèce de *Medicago*, sauf *M. sativa*.

L'un des premiers travaux de sélectionneurs australiens fut, dès 1930, de rechercher et de trier parmi les écotypes naturalisés, introduits accidentellement par les colons, à partir du Bassin méditerranéen, ceux qui répondaient le mieux au système d'exploitation 'ley farming'.

Les chercheurs australiens ont prospecté dès 1950 du matériel végétal dans la plupart des pays méditerranéens et océaniques, depuis les pays du Moyen Orient jusqu'en Grande-Bretagne. Ainsi, plus de 15 000 écotypes de toutes les espèces annuelles connues du genre ont été collectés et sont conservés à l'Australian Medicago Genetic Resource Center (AMGRC) basé à Adélaïde, en Australie (Prosperi et al., 1993). Ainsi, le premier cultivar de *M. truncatula*, appelé Jemalong, provenant de plantes sauvages, a été sélectionné en Australie. Par la suite, plusieurs cultivars de *M. truncatula* sont enregistrés (Hannaford, Cyprus, Ghor, Akbar, Ascot, Cyfield etc...) dans ce pays. Les origines et les principales caractéristiques des cultivars sont présentés par Nair et Howie (2006) dans un article en ligne.

L'institut national de la recherche agronomique (INRA) de Montpellier a sélectionné un cultivar dénommé 'Salernes' utilisé, avec *Medicago polymorpha*, *M. rigidula*, *M. minima* et *M. orbicularis*, dans trois grands domaines en France pour:

- Améliorer la quantité et la qualité du fourrage dans les pâturages pour l'élevage d'ovins, pour le fromage de brebis Roquefort,
- Maintenir les sols autour des infrastructures: bord de route, voies ferrées, etc...,
- Pour éviter l'érosion du sol due aux pluies et aux vents, réduire l'utilisation d'herbicides, les infiltrations de pesticides dans les sols et améliorer la vie souterraine dans les vignobles en pente.

3.2. Classification botanique de *Medicago truncatula* Gaertn

Medicago truncatula Gaertn, appelée aussi luzerne tronquée, est une espèce à graines jaunes, à gousses épineuses, globuleuses ou cylindriques, aplaties à chaque extrémité (en barillet). Les spires jointives de la gousse portent des épines recourbées et perpendiculaires à

leur plan. La plante, glabre ou légèrement velue, ramifiée à la base, à folioles arrondies, a une ou deux fleurs jaunes par pédoncule (Fig. 13).



Figure 13 : Feuilles, fleurs, gousses et graines de *Medicago truncatula* Gaertn
(<http://www.tela-botanica.org/>)

Elle est commune en Afrique du Nord (Lapeyronie, 1982) où il existe plusieurs variétés sélectionnées, intéressantes dans l'assolement *Medicago*-céréales. Certains types sont résistants à des températures inférieures à $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$. La classification de cette plante est donnée dans le tableau 9.

Tableau 9 : Classification de *Medicago truncatula*

Règne	<u>Plantae</u> - plantes
Sous-règne	<u>Viridiplantae</u>
Infrakingdom	<u>Streptophyta</u> -plantes terrestres
Superdivision	<u>Embryophyta</u>
Division	<u>Tracheophyta</u> - plantes vasculaires, trachéophytes
Subdivision	<u>Spermatophytina</u> - spermatophytes, phanérogames
Classe	<u>Magnoliopsida</u>
Super-ordre	<u>Rosanae</u>
Ordre	<u>Fabales</u>
Famille	<u>Fabaceae</u> - Pois, légumineuses
Genre	<u>Medicago</u> L. - Luzerne
Espèce	<i>Medicago truncatula</i> Gaertn.

Source:http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=506312 (page consultée le 13 décembre 2016).

La plante appartient à la famille botanique des *Fabacées*, plus couramment nommée légumineuses ou *Papilionacées* (Doyle et Luckow, 2003). C'est une plante annuelle herbacée, ramifiée, au port souvent rampant de 15 à 80 cm de long. Elle porte des feuilles trifoliolées, de petites fleurs jaunes de 5 à 8 mm de diamètre qui donnent après autofécondation des gousses cylindriques très dures, en forme de vrilles renfermant 4 à 6 graines.

Les dernières ont une durée de vie supérieure à 40 ans. Leur dormance peut être levée facilement. Leur cycle de vie dure de 2 à 3 mois. Chaque plante produit alors de 500 à 1000 graines et peut être aisément multipliée par bouturage.

Son habitat est variable (Lesins et Lesins, 1979), la plante prédomine dans les zones à climat sec, sur des sols lourds (marneux ou argileux). Comme toutes les légumineuses, la principale caractéristique biologique de *Medicago truncatula* est sa capacité de fixer l'azote atmosphérique grâce à ses nodules, hébergeant des bactéries appelées *Sinorhizobium meliloti*, situés sur les racines.

3.3. Propriétés du modèle *Medicago truncatula*

Historiquement, le choix de *M. truncatula* résulte d'un programme de l'INRA de France (1985-1986) dont l'objectif est de définir une espèce modèle à l'intérieur du genre, afin de l'associer à *Sinorhizobium meliloti*, bactérie symbiotique de la luzerne. *Medicago truncatula* présente un intérêt particulier, en plus de sa parenté avec la luzerne cultivée (*Medicago sativa*), qui est la légumineuse fourragère économiquement la plus importante au monde, elle a un intérêt agronomique propre, puisqu'elle est utilisée comme plante fourragère dans beaucoup de régions du monde, incluant la zone méditerranéenne, l'Afrique du Sud et l'Australie (Crawford et al., 1989).

Jusqu'aux années 1990, il n'existait que deux plantes modèles. La première, *Arabidopsis thaliana* (L.), de la famille des crucifères, a permis des progrès considérables dans la connaissance des bases moléculaires de la biologie des plantes. Le séquençage de son génome, a permis d'avoir des outils de génétique et de génomique disponibles pour accélérer la recherche. La deuxième plante modèle fut le riz pour les monocotylédones (céréales) qui sont le groupe de plantes cultivées économiquement le plus important. Cependant, ces deux espèces ne sont pas suffisantes pour représenter toute la diversité biologique du monde végétal.

Les Légumineuses d'intérêt présentent des inconvénients majeurs qui en font de mauvais modèles d'étude. La luzerne (*Medicago sativa*) et l'arachide (*Arachis hypogaea*) sont tetraploïdes, le pois (*Pisum sativum*) possède un génome de taille importante, qui présente des duplications chez le soja (*Glycine max*). D'autres plantes sont allogames, difficiles à transformer ou possédant un temps de génération d'une longue durée.

M. truncatula est diploïde ($n = 8$) et autogame, produit des graines en abondance avec un temps de génération de 10 à 12 semaines (de graine à graine). La taille de son génome est de 500 Mb. La biodiversité de l'espèce se caractérise par une grande variabilité morphologique et génétique intra et inter-populations et par une importante homozygotie au niveau individuel (Bonin et al., 1996). Cette plante est maintenant bien établie comme modèle pour les légumineuses et permet diverses études relatives aux symbioses de fixation d'azote et des interactions mycorhiziennes, mais aussi aux réponses au stress abiotiques, et aux attaques d'agents pathogènes.

3.4. Intérêt économique et scientifique de *Medicago truncatula*

3.4.1. Intérêt agronomique

Les luzernes sont spontanées dans toute la zone méditerranéenne, le Turkestan et la Chine. Ce sont des plantes qui s'accommodent des sécheresses périodiques (Lapeyronie, 1982). Il existe de nombreuses espèces de *Medicago* dans le monde, dont plus d'une vingtaine dans le pourtour méditerranéen. En Algérie, *M. polymorphe*, *M. truncatula*, *M. orbicularis*, ont la dispersion la plus large (Abdelguerfi et Laouar, 1999).

En Australie, la luzerne tronquée (*Medicago truncatula*) est l'espèce annuelle la plus importante de *Medicago* semée pour le fourrage dans le système d'exploitation 'ley farming', avec plus de 4,5 millions d'hectares (Pearson, 1997). Cette espèce peut se cultiver en association avec des graminées (*Phalaris aquatica*, *Lolium rigidum*), cependant celle-ci se comporte mieux en culture pure (Small, 2011). Des rendements de matière sèche de 4,5 à 4,96 t / ha ont été rapportés à l'Ouest de l'Australie (Small, 2011).

La plante possède un intérêt agronomique majeur pour la production fourragère en zone sèche, et pourrait aussi être cultivée dans le but de diminuer l'épandage d'engrais azotés. Son intérêt est étroitement lié à sa capacité de se ressemer naturellement d'une année à une autre. Cette propriété peut aboutir à une installation pérenne adaptée aux aléas climatiques des zones méditerranéennes, diminuant ainsi le phénomène d'érosion des sols. Par ailleurs, de

nombreuses espèces et sous-espèces présentent aussi des caractères d'intérêt agronomique qu'il serait souhaitable d'introduire par génie génétique dans la luzerne cultivée, tels que la tolérance au pâturage (capacité d'enracinement et de repousse), la résistance à la sécheresse, à la salinité et aux maladies.

3.4.2. Intérêt génétique

M. truncatula présente plusieurs avantages qui la prédisposent aux études génétiques. C'est une plante annuelle, diploïde, autogame avec un faible niveau de ploïdie.

C'est une espèce avec un génome de petite taille, 5 100 pb, soit environ 4 fois celui de *Arabidopsis* (Blondon *et al.*, 1994). C'est également une plante apte à la transformation rapide par *Agrobacterium tumefaciens* (Chabaud *et al.* 2003) et à la régénération par embryogenèse somatique (Thomas *et al.*, 1992; Chabaud *et al.*, 1996). Elle possède une aptitude à la culture en laboratoire (elle forme de petites graines permettant sa culture dans des tubes à essais).

M. truncatula a permis d'identifier un grand nombre de gènes, reliés à la symbiose dont certains ont déjà été isolés, séquencés et leur expression étudiée (Gamas *et al.* 1996).

Plusieurs projets à grande échelle sur la génomique de *M. truncatula* ont été lancés par la communauté scientifique et des outils essentiels sont développés pour la génomique structurale et fonctionnelle suite au développement des ressources bioinformatiques (Frugoli et Harris, 2001).

3.4.3. *M. truncatula*, espèce de référence pour la génomique comparative des légumineuses

D'un point de vue phylogénétique, *Medicago truncatula* est plus proche des principales légumineuses cultivées en Europe. Elle présente un fort degré de synténie (ordre d'alignement des marqueurs ou des séquences le long des chromosomes) avec d'autres légumineuses cultivées, telles que le pois, le soja et la luzerne (Choi *et al.*, 2004a).

L'étude de la phylogénie des gènes de résistance chez les légumineuses a permis de constater que ces gènes sont moins représentés, voire absents, chez *Arabidopsis* (Journet *et al.* 2001), plante modèle des crucifères. Ce résultat suggère que *Arabidopsis* n'est sans doute pas un bon modèle pour étudier les gènes de résistance aux maladies des légumineuses cultivées.

Dans une étude récente, la macrosynténie entre les couples, impliquant *M. truncatula*, *Lotus japonicus* et 4 autres espèces, a été explorée en détail (Choi *et al.*, 2004a). Plusieurs

études ont permis de mettre en évidence le haut niveau de macrosynténie existant entre *M. truncatula* et *Pisum sativum*, malgré leurs différences morphogénétiques.

Certains travaux ont par ailleurs montré un degré élevé de macrosynténie avec *M. sativa* (à partir de 80 marqueurs environ). Le développement de tels marqueurs devrait permettre d'établir des liens entre les cartes génomiques de plusieurs légumineuses. L'objectif à terme est de construire une carte composite des génomes de légumineuses, qui devrait permettre de passer aisément d'un génome à l'autre et faciliter le clonage des gènes d'intérêt agronomique chez les légumineuses cultivées (tétraploïdes et/ou avec de trop grands génomes) en clonant d'abord leurs orthologues chez *M. truncatula* (Frugoli et Harris, 2001).

L'étude de la génomique des légumineuses a connu ces dernières années un progrès considérable, grâce au développement des ressources génétiques et génomiques pour *M. truncatula* et *L. japonicus*, ainsi que chez le soja en raison de son importance économique considérable (Zhu *et al.*, 2005).

3.5. Les Ressources naturelles chez *M. truncatula*

M. truncatula fait l'objet de nombreuses collections dans le monde. Un total de 5 700 populations naturelles constitue les collections mondiales (**Tableau 9**). Dix-sept pour cent des ressources collectées proviennent de la Tunisie. Les collections sont gérées par quatre principaux centres répertoriés ci-dessous:

- **Australian *Medicago* Genetic Resource Centre (AMGRC)**

La collection la plus importante de *Medicago* se trouve en Australie (Adélaïde), dans le centre australien des ressources génétiques sur la luzerne (The Australian *Medicago* Genetic Resources Center). Le but de cette collection était surtout l'évaluation de génotypes provenant de la région méditerranéenne pour l'amélioration des pâturages. Cette collection compte, de nos jours, 22 234 accessions réparties sur 34 espèces de *Medicago* dont 20 997 espèces annuelles provenant de 64 pays différents (Skinner *et al.*, 1999).

- **Institut National de la recherche Agronomique (INRA), France, Biological Resources Center “*Medicago truncatula*”**

Au Département de Génétique et d'Amélioration des Plantes de l'INRA, les luzernes pérennes et annuelles (dont *Medicago truncatula*) font l'objet de recherche pour les légumineuses fourragères (<http://www.montpellier.inra.fr/BRC-MTR/accueil.php?menu=pageaccueil>).

- **Agricultural Research Service (ARS), United States Department of Agriculture (USDA)**

Ce centre possède 323 accessions de *M. truncatula*, collectées ou bien données, depuis les années cinquante. Les informations requises pour l'ensemble de ces accessions sont publiées sur le web, sur le site GermplasmResources Information Network (GRIN) (<http://www.ars-grin.gov/npgs/>).

▪ **Laboratoire Interactions Légumineuses Microorganismes (LILM), Centre de Biotechnologie, Technopole de Borj-Cédria (CBBC), Tunisie**

Au sein de ce laboratoire, 14 populations naturelles de *M. truncatula* ont été collectées et 184 lignées pures ont été retenues. Plusieurs lignées contrastantes sont identifiées pour des caractères d'intérêt agronomique.

Plusieurs pays, dont l'Algérie, participent évidemment à l'enrichissement de la collection mondiale (Tab. 10).

Tableau 10 : Distribution des populations de *Medicago truncatula* collectées dans différents pays et composant les collections mondiales existantes.

Pays	population	Pays	population	Pays	population
Algérie	755	Turquie	50	Turkménistan, Azerbaïdjan	3
Tunisie	951	Chypre	424	Russie	1
Maroc	909	Malte	6	Europe de l'est	7
Lybie	413	Grèce	355	Ethiopie	1
Egypte	2	Italie	292	Amérique	3
Jordanie	38	France	142	Australie	612
Israël	296	Espagne	226	Afrique du sud	7
Iran	3	Portugal	110	Inconnu	68
Syrie	3	Canary et Madeira	13		
Total					5700

http://www.noble.org/MedicagoHandbook/pdf/Wildaccession_Population.pdf

3.6. Interactions de *M. truncatula* avec les insectes et les microorganismes

3.6.1. Interactions avec les insectes

Medicago truncatula, comme les autres légumineuses, est l'hôte d'un large éventail d'arthropodes. En Australie, où cette plante est cultivée pour les pâturages, Edwards et Singh (2006) rapporte qu'un certain nombre d'insectes et d'acariens sont des parasites de *M. truncatula*. Dès la phase de mise en place de la culture, les plants sont attaqués par des acariens à pattes rouges (*Halotydeus destructor*), le puceron bleu-verdâtre (*Penthaleus major*), la mite bleue (*Penthaleus major*), les pucerons des tâches de la luzerne (*Acyrtosiphon kondoi*), les larves de sitoine (*Therioaphis trifolii maculata*), les larves de charançon (*Sitona discoideus*) et l'arpenteuse brune des pâturages (*Ciampa arietaria*).

La résistance génétique de *M. truncatula* contre les insectes a été identifiée seulement contre les pucerons : gènes de résistance dominants individuels conférant une résistance contre le puceron du pois, le puceron bleu vert (Edwards et Singh, 2006).

3.6.2. Interactions avec les microorganismes symbiotiques

Les bactéries symbiotiques du genre *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* et *Sinorhizobium*, connues collectivement comme *Rhizobia*, sont capables d'induire dans leurs hôtes (légumineuses) la formation de nodosités, au niveau des racines, qui hébergent des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique.

Les légumineuses sont capables, comme la plupart des plantes sauvages ou cultivées, de s'associer à des champignons symbiotiques pour former des endomycorhizes. Ces deux types d'interactions symbiotiques, qui n'existent pas chez *Arabidopsis* ni chez les Crucifères en général, jouent un rôle très important dans la nutrition minérale.

Medicago truncatula est un très bon modèle pour l'étude des interactions avec des agents symbiotiques. La protéomique comparative basée sur le temps a conduit à l'identification de plusieurs protéines de *M. truncatula* induites pendant la symbiose, soit avec *Sinorhizobium meliloti*, mais aussi avec le champignon mycorhizien *Glomus mosseae*. L'analyse du protéome de la racine symbiotique de *M. truncatula* lors de l'infection par *Glomus mosseae* a révélé l'induction de 14 protéines à l'étape apressoriale (4 jours après l'infection) et 24 protéines au stade symbiose (3-4 semaines après l'infection) (Colditz et Braun, 2010).

Les protéomes des nodules ont également été analysés sous stress hydrique. Il a été montré par exemple que la réduction de la fixation symbiotique de l'azote chez *M. truncatula* pendant la sécheresse, était due principalement à une réduction des enzymes métaboliques, en particulier celles de la saccharose synthase, de la leghémoglobine et des enzymes des voies de biosynthèse des acides aminés (Larrainzar et al., 2007).

3.6.3. Interactions avec les agents pathogènes

L'importance de *M. truncatula* réside aussi dans ses interactions avec plusieurs microorganismes pathogènes. Dans un travail de screening de la collection australienne de *Medicago* spp. avec des agents pathogènes foliaires, Ellwood et al. (2001, 2005b) ont montré que *M. truncatula* est un hôte pour beaucoup de champignons nécrotrophes (Tab. 11).

Tableau 11: Les champignons donnant des réponses différentielles sur des populations de *Medicago truncatula*.

Espèce	Hôte d'origine	Maladie
<i>Ascochyta lentis</i>	<i>Lens culinaris</i>	Anthraxnose
<i>A. rabiei</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Anthraxnose
<i>Colletotrichum trifolii</i>	<i>Medicago sativa</i>	Anthraxnose
<i>C. coccodes</i>	<i>Lupinus albus</i>	Anthraxnose
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>M. sativa</i>	Fusariose
<i>Leptosphaerulina trifolii</i>	<i>M. truncatula</i>	Tache foliaire
<i>Mycosphaerella pinodes</i>	<i>Pisum sativum</i>	Tache noire
<i>Phoma medicaginis</i>	<i>M. truncatula</i>	Tige noire
<i>Stagonospora meliloti</i>	<i>M. sativa</i>	Tache foliaire et pourritures racinaires

Source: http://www.noble.org/MedicagoHandbook/pdf/WildAccessions_Populations.pdf

L'agent causal des tiges noires de la luzerne cultivée (*Phoma medicaginis*) est particulièrement dommageable. Les tiges ne sont pas seules atteintes : feuilles, pétioles et gousses sont également sensibles et présentent des lésions brun foncé à noires, de taille variable, portant des pycnides (Angevain et *al.*, 1983). En Tunisie, les prospections effectuées par Djebali (2008) ont permis d'isoler le champignon à partir de *Medicago truncatula*, *M. ciliaris* et *M. polymorpha*.

Par ailleurs plusieurs champignons et oomycètes transmis par le sol infectent les racines des légumineuses et causent des dommages aux plantes hôtes qui peuvent entraîner des pertes économiques considérables. Bien que les aspects physiologiques de nombreuses pathogènes soient bien caractérisés, on sait souvent peu de choses sur les mécanismes moléculaires des maladies et, ce qui est le plus important, la nature des réponses cellulaires de l'hôte (Colditz et Braun, 2010).

La plante offre un modèle réaliste et une plateforme riche pour identifier et isoler les gènes de résistance impliqués dans les différentes voies de signalisation (Ellwood et *al.*, 2006).

Une analyse génétique des lignées recombinantes, à partir d'un croisement entre A17 et F83005.5, a mis en évidence un QTL majeur de résistance au flétrissement bactérien sur le

chromosome 5. Suite à une inoculation sur des racines, les bactéries entrent dans le système vasculaire où elles se propagent. Chez la lignée sensible A17, les bactéries atteignent les parties aériennes et les colonisent, tandis que chez la lignée résistante F83005.5, elles restent confinées dans les racines. Des études préliminaires montrent que des gènes de défense sont induits dans les parties aériennes suite à l'inoculation (Ramirez, 2009).

Par ailleurs, les travaux de Ben et *al.* (2012) montrent que deux combinaisons distinctes de QTL sur le chromosome 7 et le chromosome 2 et 6 gouvernent la résistance à *Verticillium* chez *M. truncatula*.

Des sources de résistance à d'autres agents pathogènes sont décrites chez *M. truncatula*, comme par exemple contre *Phoma medicaginis* (Ellwood et *al.*, 2006; Djebali et *al.*, 2007) et *Erysiphe pisi* (Ameline-Torregrosa et *al.*, 2008).

Bien que certains agents pathogènes soient des nécrotrophes stricts, tels que *Colletotricum capsici* ou *C. gloeosporioides*, la majorité sont hémibiotrophes comme *C. lindemuthianum* et *C. trifolii*, deux espèces phylogénétiquement très proches et responsables respectivement de pertes importantes sur le haricot et la luzerne (Perfect et *al.*, 1999).

Chapitre IV

Mécanismes de défense chez les plantes

Agrios (1997) considère que les plantes supérieures ont un large éventail de mécanismes pour se protéger contre diverses menaces tels que les stress physiques (blessures, salinité, sécheresse, froid, rayons ultraviolets), chimiques (métaux lourds et polluants atmosphériques) et biologiques (attaques des agents pathogènes, comme les champignons, les bactéries et les virus)

La réaction des plantes à ces facteurs sont très complexes, et impliquent l'activation d'une série de gènes codant pour différentes protéines. Les stress biotiques et abiotiques peuvent induire des changements biologiques et physiologiques au niveau des plantes par :

- Le renforcement physique de la paroi de la cellule par la lignification, la subérisation, et le dépôt de callose,
- La production de composés phénoliques, des phytoalexines et des protéines (PR) liées à la pathogénèse qui protègent contre diverses invasions parasitaires.

La caractérisation précise des produits de gènes de défense permet d'établir l'existence de trois grandes catégories de composés:

- les composés structuraux,
- les protéines de défense incluant les enzymes, les protéines de stress et les inhibiteurs
- et les composés issus du métabolisme secondaire.

Toutes ces molécules exercent un rôle antimicrobien direct ou indirect (Benhamou, 1999).

La reconnaissance d'un pathogène, par l'intermédiaire de ses MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns), provoque dans un premier temps des défenses qualifiées de « basales ». Ces dernières ne sont pas vraiment spécifiques à un pathogène donné (Bent et Mackey, 2007). Les mécanismes de défense comprennent :

- De façon constitutive, des barrières physiques à la pénétration de pathogènes (cires) et des barrières chimiques (métabolites secondaires etc...)
- De façon inductible, des barrières physiques causées par l'accumulation de lignine et/ou de callose au niveau des sites d'infection, et des barrières chimiques causées par la néosynthèse de métabolites secondaires et de protéines de défense.

4.1. La formation de barrières structurales

Après une infection, les parois des cellules végétales peuvent être renforcées par des dépôts de substances comme la callose, la pectine, la lignine.

4.1.1. La formation de papilles et d'appositions pariétales

Les papilles, appelées aussi «papillae», sont des protubérances hémisphériques formées entre la paroi et la membrane plasmique rétractée dans un espace appelé paramural. Elles sont observées également au niveau des plasmodesmes, dans les cellules saines jouxtant les zones nécrosées.

Les papilles (Fig. 14) sont principalement constituées de callose, de matières pectiques, de calcium et/ou de lignine (Benhamou, 2009). Elles se forment au niveau du site d'infection et créent un obstacle physico-chimique à la pénétration du pathogène (Hückelhoven, 2007).

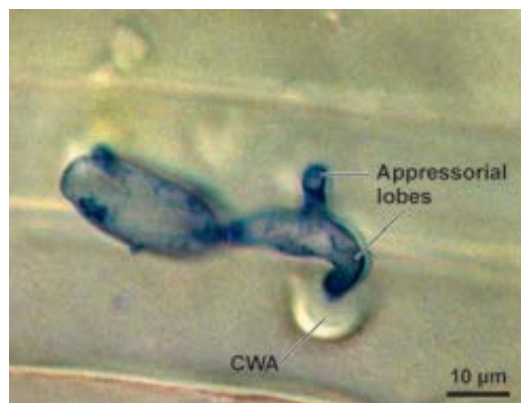


Figure 14: Résistance à la pénétration de l'appressorium de *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* associée à la paroi cellulaire de l'orge (la spore germe en produisant deux lobes d'appressorium après que le premier (en bas) ait échoué à pénétrer la cellule épidermique de l'orge). La plante a achevé la formation des appositions pariétales (papillae=CWA) 48 heures après l'inoculation (Hückelhoven, 2007).

Les premiers signes microscopiques, visibles dans les zones qui avoisinent les sites de formation de papilles, incluent : l'apparition d'un halo dans la paroi, l'agrégation du cytoplasme près de la zone de pénétration du pathogène, les dépôts progressifs de composés structuraux (papilles) et la consolidation des papilles nouvelles par l'incrustation de substances phénoliques (Benhamou, 1995 ; Benhamou, 2009). Les papilles semblent être produites par des cellules dans les minutes qui suivent la blessure et dans les 2 à 3 heures après inoculation par des microorganismes (Agrios, 2005).

4.1.1.1. La callose

Dans certains cas, des bouts d'hyphes de champignons pénétrant à travers la paroi cellulaire sont enveloppés par une matière cellulosique (callose) qui plus tard sera infusée avec des substances phénoliques en formant une gaine autour de l'hyphe (Fig. 15).

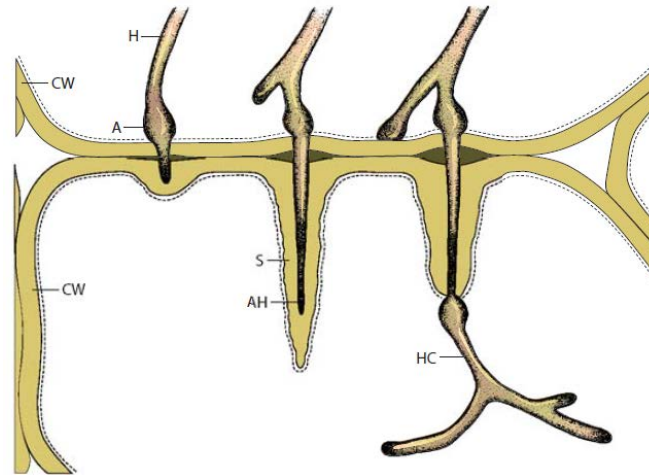


Figure 15: Formation d'une gaine autour d'un hyphe (H) pénétrant dans une paroi cellulaire (CW). A, appressorium; AH, l'hyphe avance tout en restant enfermée dans une gaine ; HC, hyphe à l'intérieur du cytoplasme; S, gaine (Agrios, 2005).

La callose est un polymère d'unités glucose reliées par des liaisons β -1,3. Son rôle comme constituant des papilles dans la défense des plantes a été acceptée depuis longtemps (Aist, 1976).

L'un des systèmes les mieux étudiés est sans doute l'interaction entre l'orge et le champignon *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* responsable de l'oïdium sur cette plante. Le champignon attaque les cellules épidermiques de la céréale et tente de faire pousser un haustorium à l'intérieur de celles-ci. Pour empêcher la pénétration, ces cellules réagissent par renforcement local de la paroi cellulaire sous le site de la tentative de pénétration en formant une papille. Ce procédé implique le dépôt de callose avec accumulation de H_2O_2 , de composés phénoliques et diverses protéines et glycoprotéines ayant des propriétés hydrolytiques et antifongiques (Zeyen et al., 2002).

La callose se dépose au niveau des sites stratégiques tels que les pores des tubes criblés, les plasmodesmes, les membranes de ponctuation dans les vaisseaux du xylème et les appositions pariétales en réponse à un stress biotiques (Northcote et al., 1989).

les appressoriums fongiques et à l'action de l'eau et donc moins accessible aux enzymes qui dégradent les parois cellulaires (Ebrahim et *al.*, 2011).

L'analyse microscopique des sites d'inoculation d'une feuille de concombre par *Colletotrichum lagenarium* révèle une lignification des cellules de l'épiderme de l'hôte au niveau du point de contact avec les appressoriums (Lepoivre, 2003).

«La lignine est le principal composant de la résistance des papilles vis-à-vis des enzymes de macération des pathogènes. Elle rend les parois cellulaires plus résistantes aux forces de la pression mécanique, limite la diffusion de toxines et enzymes du parasite vers l'hôte et empêche le passage des substances nutritives de l'hôte vers le parasite.» (Lepoivre, 2003).

4.1.2. L'occlusion des espaces intercellulaires

Les espaces intercellulaires sont le lieu de passage privilégié des bactéries et des champignons phytopathogènes. Selon Benhamou et *al.* (1994), en réponse à un stress biotique et des traitements par des éliciteurs (chitosane), les espaces intercellulaires se remplissent de composés de natures et de structures hétérogènes. Dans certains cas, c'est un fuseau fibrillaire et/ou vésiculaire et dans d'autres, ce sont des gouttelettes polymorphes capables de fusionner entre elles pour former un revêtement dense. Ces composés jouent un double rôle, l'un physique en piégeant les structures du parasite, et l'autre antimicrobien (Benhamou, 2009).

4.2. La production de métabolites secondaires

Deux catégories de métabolites secondaires sont impliquées dans l'immunité du fait de leur action antimicrobienne : Les phytoanticipines, produites de façon constitutive, et les phytoalexines, synthétisées *de novo* et s'accumulant dans la zone d'interaction avec le microorganisme, ainsi qu'en réponse aux éliciteurs.

En fonction de leur origine, les métabolites secondaires peuvent être classés en trois types : les terpénoïdes (ou isoprénoïdes), les alcaloïdes, et les composés phénoliques.

Les terpènes dérivent de l'isopentényldiphosphate, les alcaloïdes dérivent des acides aminés et les composés phénoliques dérivent de la voie de la phénylalanine et de l'acétate/malonate.

De nombreux composés phénoliques sont connus pour leur implication dans les mécanismes de défense des plantes supérieures (Bouchet et *al.*, 1999). Dans ce cadre, ils sont soit constitutifs soit induits (Morrissey et Osbourn, 1999).

4.2.1. Composés phénoliques constitutifs de défense

Les systèmes de défense préventifs sont des barrières préformées qui peuvent être de nature physique ou chimique. Les défenses constitutives physiques constituent une barrière mécanique difficile à franchir par les micro-organismes pathogènes. Dans ce cas, la morphologie de la plante limite la progression des pathogènes. La cire, la cutine ainsi que la subérine sont des exemples de composés qui forment des structures physiques qui bloquent la pénétration des micro-organismes parasites ou empêchent efficacement leur progression.

La cuticule est identifiée comme l'élément participant à la protection contre les attaques de *Botrytis cinerea* chez *Arabidopsis thaliana* (Bessire et al., 2007). La lignine est la barrière physique constitutive de nature phénolique la plus répandue.

Les trichomes jouent également un rôle important dans la défense. Une corrélation entre la densité de trichomes et la protection de la plante est maintenant mise en évidence (Stenglein et al., 2005). Les barrières chimiques sont généralement des molécules solubles, naturellement toxiques vis-à-vis des micro-organismes et des champignons parasites. On appelle phytoanticipines ces molécules constitutives, de faible poids moléculaire, qui présentent ce caractère antibactérien ou antifongique (Van Etten et al., 1994). Les tannins retrouvés dans le bois sont un exemple de composés phénoliques qui possèdent cette propriété (Scalbert, 1991).

4.2.2. Composés phénoliques de défense induits

Le terme phytoalexine désigne les métabolites secondaires de faible poids moléculaire formés par la plante suite à une infection et possédant, entre autres, une activité antimicrobienne marquée (Harborne, 1999). Les phytoalexines sont produites en quantités appréciables dans les plantes après stimulation par des micro-organismes phytopathogènes ou après une blessure mécanique et chimique (Agrios, 2005). Trois sentiers métaboliques sont à l'origine des principaux précurseurs des phytoalexines : le sentier shikimique, le sentier acétate-mévalonnate et le sentier acétate malonnate (Fig. 17).

Les composés phénoliques de défense induits sont par définition des phytoalexines, cependant toutes les phytoalexines ne sont pas des composés phénoliques. Une grande variété de métabolites secondaires, dont de nombreux alcaloïdes et terpènes, répondent à cette définition. La frontière n'est pas toujours claire et une dualité existe dans la terminologie entre phytoalexine et phytoanticipine (Van Etten et al., 1994).

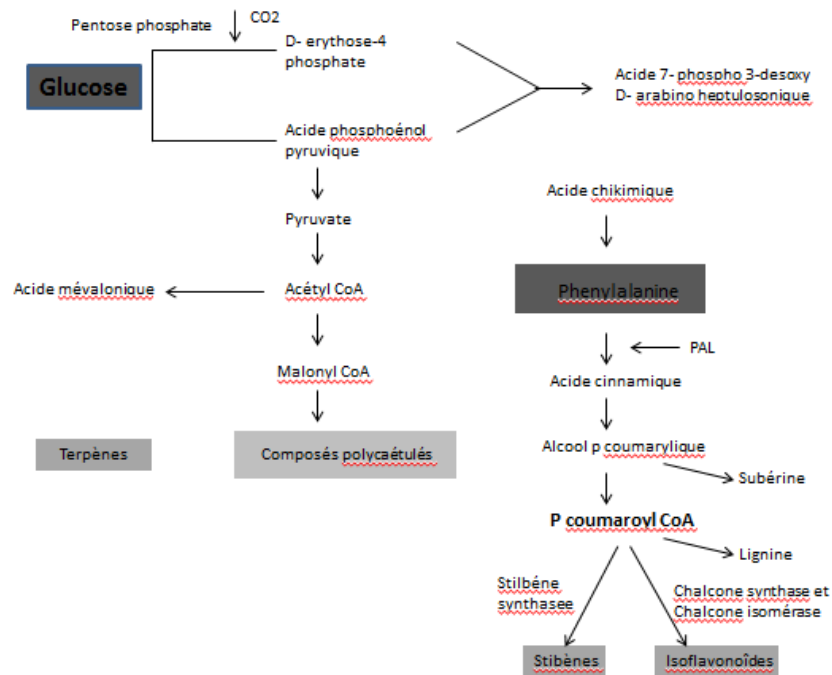


Figure 17: Biosynthèse des principales classes de phytoalexines (Benhamou, 2009).

La production des phytoalexines est un phénomène général, important dans le cadre de l'infection et de la résistance. Toutefois, peu de phytoalexines sont en relation avec la résistance variétale (Boulenouar et *al.*, 2011) .

Selon Corbaz (1990) les phytoalexines ne sont pas des produits finaux stables. Elles sont produites après une durée comprise entre 6 et 96 heures après l'infection. Elles sont produites par des cellules saines, adjacentes à des cellules endommagées et nécrotiques, en réponse à des matériaux diffusants à partir des cellules endommagées. Elles ne sont pas produites au cours des infections biotrophes compatibles. Elles s'accumulent autour des deux tissus nécrotiques résistants et sensibles (Agiros, 2005).

La medicarpin et la maackian sont des phytoalexines produites par des plantules de pois chiche, elles sont facilement induites avec des extraits de certaines levures (Cherif, 2007).

4.3. La production de PR protéines

C'est en 1970 que les PR-protéines furent identifiées dans les feuilles de tabac réagissant à l'interaction au virus de la mosaïque du tabac par des lésions hypersensibles (Lepoivre, 2003). L'évolution de la protéomique a permis une détection efficace et simultanée d'un grand nombre de protéines dans les plantes (Vanderschuren et *al.*, 2013).

Sels et *al.*, (2008) définit les PR-protéines comme étant : « des protéines non détectables, ou seulement à une concentration basale, dans les tissus sains, mais dont l'accumulation au niveau protéique a été démontrée dans des conditions pathologiques, dans au moins deux combinaisons plante-microorganisme pathogène, et qui sont relatives à la défense.»

Les principales caractéristiques des PR protéines se résument comme suit :

- poids moléculaire compris entre 10 et 30 kDA,
- solubilité,
- stabilité en milieu acide,
- grande résistance à la digestion protéolytique, propriété qui leur confère une grande stabilité dans les environnements défavorables où elles s'accumulent notamment dans la vacuole et dans les espaces intercellulaires colonisés par des agents pathogènes.
- localisation principalement extracellulaire, plus précisément dans les parois et les espaces intercellulaires (Kauffman et *al.*, 1999).

La majorité des PR protéines acides sont situées dans les espaces intercellulaires, alors que les PR protéines basiques sont essentiellement localisées dans la vacuole (Legrand et *al.*, 1987; Niki et *al.*, 1998). Les PR Protéines s'accumulent localement dans les tissus infectés, les tissus environnants ainsi que dans les tissus éloignés non infectés. La plupart des PR protéines identifiées semblent avoir un potentiel antimicrobien direct (ex. chitinases et glucanases) ou indirect (ex. osmotines et permatines). Elles se forment aussi lors de la sénescence, de la floraison, ou dans des conditions de croissance particulières. Certaines autres se sont avérées être des chitinases (PR-3, PR-4, PR-8 et PR-11), des glucanases (PR-2), des protéines antifongiques (PR-1, PR-5), des inhibiteurs de protéases (PR-6) ou ayant une activité ribonucléase-like (Agrios, 2005; Melchers et *al.*, 1994).

Elles sont classées en 17 familles en fonction de leurs propriétés physicochimiques et leurs fonctions (Tab. 12).

Gajera et *al.* (2015) montrent que *Trichoderma viride*, un champignon utilisé en lutte biologique, est capable de provoquer l'induction de PR protéines chez l'arachide et de réduire indirectement la virulence de *Aspergillus niger*, responsable de la pourriture du collet de cette plante.

Tableau 12 : Activité biologique et sites d’actions de 17 classes de protéines PR Benhamou (2009).

Protéines PR	Activité biologique	Site d’action
PR1	Antifongique (oomycètes)	?
PR2	B-1,3-glucanase	Paroi fongique
PR3	Chitinases, types I, II, IV, V, VI et VI	Paroi fongique
PR4	Chitinases, type I, II	Paroi fongique
PR5	Thaumatine-like, osmotiques	Membrane plasmique
PR6	Inhibiteur de protéase	Protéases
PR7	Endoprotéinase	Protéines
PR8	Chitinases, types III et lysosyme	Paroi fongique et bactérienne
PR9	Peroxydase	H ₂ O ₂ , lignine, HRGPs
PR10	Ribonucléase	ARN
PR11	Chitinase, type I	Paroi fongique
PR12	Défensines	Membrane plasmique
PR13	Thionines	Membrane plasmique
PR14	Protéines de transfert de lipides (LTP)	Phospholipides membranaires
PR15	Oxalate-oxydase	Membrane plasmique
PR16	Oxalate-oxydase-like	Membrane plasmique
PR17	Inconnu	?

4.3.1. Les protéines PR-1

C’est le groupe de protéines le plus abondant induites en réponse à une grande variété de stress. La famille des PR-1 est connue pour ses propriétés anti-oomycètes et antifongiques mais son mode d’action reste encore énigmatique (Pape et *al.*, 2010). Il existe trois types de protéines PR-1 : les PR-1a, les PR-1b et les PR-1c. La localisation extracellulaire des PR-1 est parfaite pour un contact direct avec l’agent pathogène (Benhamou, 2009).

4.3.2. Les hydrolases : glucanases et chitinases

Plusieurs familles de PR protéines sont des hydrolases. Les PR-2 sont des glucanases, les PR-7 des endoprotéinases, les PR-3, 4, 8, et 11 des chitinases.

L’action antimicrobienne des glucanases et des chitinases vient de leur capacité à hydrolyser les parois fongiques. Il a été démontré que ces deux enzymes agissent de concert pour attaquer la paroi fongique et libérer, éventuellement, des fragments éliciteurs de réactions de défense (Lawrence et *al.*, 2000).

Chez la plupart des champignons pathogènes (à l’exception des oomycètes), la couche de chitine est recouverte d’une couche de β -1,3-glucanes. Cette particularité contribue à

rendre la chitine inaccessible aux chitinases, aussi longtemps que la couche de β -1,3-glucanes n'est pas hydrolysée par les β -1,3-glucanases.

4.3.2.1. Les β -1,3-glucanases

Les enzymes capables d'hydrolyser les β -1,3-glucanes se retrouvent chez un nombre étonnant d'organismes, allant des procaryotes unicellulaires et des algues eucaryotes, aux invertébrés, en passant par les bactéries, les levures et les champignons.

Les β -1,3-glucanases appartiennent à la famille PR-2 et sont subdivisées en trois classes : La classe 1 qui inclut des glucanases basiques d'environ 33 kDa, localisées dans les vacuoles ; et les classes 2 et 3 qui comprennent des glucanases acidiqes de 35 kDa environ localisées au niveau extracellulaire (Theirs et Stahl, 2004 in Benhamou , 2009 ; Ebrahim et *al.*, 2011). Chez les plantes supérieures, ces enzymes peuvent jouer un rôle dans le mécanisme de défense lors d'attaques de pathogènes. Lorsque celles-ci sont infectées par des champignons, des bactéries, ou des virus, la concentration de l'enzyme β -1,3-glucanase augmente de façon spectaculaire.

La β -1,3-glucanase, produite par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* PN1, provoque la lyse de mycélium, la vacuolisation et la granulation du cytoplasme, et des déformations des hyphes chez les champignons (Jose et *al.*, 2014).

4.3.2.2. Les chitinases

Les chitinases sont des enzymes qui catalysent le clivage d'une liaison entre C1 et C4 de deux N-acetyl- consécutifs monomères D-glucosamine de la chitine. Largement répandues dans la nature, se trouvent dans les bactéries, les champignons, les animaux et les plantes.

Chez les plantes, ce sont généralement des endo-chitinases capables de dégrader la chitine, un constituant majeur de certaines parois cellulaires fongiques et d'inhiber la croissance fongique (Broekaert, 1988 ; Schlumbaum et *al.*, 1986).

Si la chitine est présente dans l'exosquelette de plusieurs invertébrés marins (crustacés), dans la cuticule des insectes et dans les parois et septa de la plupart des champignons. Les chitinases se retrouvent chez l'ensemble des organismes vivants qu'ils soient procaryotes, eucaryotes ou de type viral.

Les chitinases végétales peuvent être synthétisées dans certains organes ou durant différentes étapes des cycles végétatifs ou reproductifs de la plante. Elles sont exprimées de

façon constitutive dans de nombreux organes, tels que les feuilles (Ancillo et *al.*, 1999), les fleurs (Takakura et *al.*, 2000), les fruits (Peumans et *al.*, 2002) et les racines (Salzer et *al.*, 2000). D'une façon générale, les chitinases, comme toutes les protéines PR, sont induites par l'acide salicylique.

4.3.3. Les oxydases

Trois familles de PR protéines sont des oxydases. Les PR-9 sont des peroxydases alors que les PR-15 et PR-16 sont des oxalate-oxydases ou des enzymes qui leur sont très proches : les « oxalate-oxydases-like ».

4.3.3.1. Les peroxydases

Les peroxydases sont des oxydases qui paradoxalement, sont des enzymes antioxydantes. Ce sont de petites glycoprotéines de 40 à 50 kDa combinées à une ferriporphyrine. Elles utilisent l'eau oxygénée comme accepteur d'électrons provenant de diverses molécules, tels que les précurseurs de la lignine ou des phénols (flavonoïdes ou autres). En plus, elles permettent également la polymérisation de certains substrats (lignine), ainsi que la destruction d'autres molécules (auxines).

Testées chez les cultivars adultes de palmier dattier, les peroxydases montrent de grandes activités chez les cultivars résistants à la fusariose vasculaire (Baaziz et *al.*, 2006).

4.3.3.2. Les oxalates oxydases

La sécrétion de l'acide oxalique stimule la virulence de champignons de diverses façons :

- en acidifiant le milieu : Plusieurs enzymes hydrolytiques fongiques, dont les polygalacturonases, expriment une activité optimale à pH acide (Chen et *al.*, 2004),
- en affaiblissant la paroi végétale, l'acide oxalique peut l'acidifier ou chélater les ions calcium,
- en étant phytotoxique, l'acide oxalique agit comme une toxine non spécifique qui est capable d'inhiber le stress oxydatif,
- en inhibant la fermeture des stomates, processus normalement régulé par l'acide abscissique.

Au cours de l'évolution, les plantes ont acquis, en retour, la capacité de détoxifier l'acide oxalique par l'intermédiaire d'enzymes oxydantes. Ces enzymes catalysent l'oxydation de l'acide oxalique CO_2 et H_2O_2 (Benhamou, 2009).

4.3.4. Les ribonucléases

Les ribonucléases appartiennent à la famille PR-10. Ce sont de petites protéines acides intracellulaires (16-19 kDa) localisées dans les vacuoles et le cytoplasme (Warner et *al.*, 1992 ; Van Loon et *al.*, 1994). Elles ont été identifiées chez un certain nombre de plantes dicotylédones et de monocotylédones. Elles sont légèrement acides et résistantes aux protéases (Jain et Kumar, 2015).

Les protéines PR10 sont codées par un petit nombre de gènes, par exemple 9 gènes chez *Lupinus lineus* (Filipenko et *al.*, 2013). Fait intéressant, les PR10 ne sont pas exprimées chez *Arabidopsis* (Lebel et *al.*, 2010).

4.3.5. Les protéines thaumatines-like

Les protéines thaumatines-like appartiennent à la famille PR-5, également appelées thaumatine-like (TLPs), elles ont été détectées dans de nombreuses espèces végétales. Elles ont un poids moléculaire d'environ 24 kDa. Majoritairement retrouvées chez les plantes, elles sont aussi produites par les levures et les bactéries. Chez la vigne, elles sont induites surtout en réponse à l'infection par le champignon responsable de l'oïdium (*Erysiphe necator*) (Benhamou, 2009).

4.3.6. Les défensines et les thionines

Appelées γ -thionines chez les plantes, les défensives sont parmi des premières classes de PAM ou encore AMP (« Antimicrobial peptide »), découverts. D'un poids moléculaire d'environ 5 kDa, elles comportent entre 45 et 54 acides aminés et ont 4, 6 ou 8 résidus cystéine. Ces caractéristiques similaires aux thionines font que les défensives prennent le nom de γ -thionines (Stotz et *al.*, 2009).

Le site d'action des défensines se situe au niveau de la membrane plasmique des champignons. En effet, la première étape de l'interaction entre les défensines et le champignon pathogène concerne leur liaison avec des sphingolipides de la membrane fongique (Thevissen et *al.*, 2004).

Les défensines (PR-12) et les thionines (PR-13) appartiennent à la grande famille des peptides antifongiques synthétisés chez tous les organismes vertébrés et invertébrés (Benhamou, 2009).

PARTIE II : MATERIEL & METHODES

Chapitre I

Matériel biologique et culture

1.1. Matériel fongique

1.1.1. Sites de collecte des échantillons

L'échantillonnage est réalisé, durant la saison 2009, à partir de cultures de pois chiche présentant des symptômes de l'antracnose. Des plants de pois chiche présentant des lésions ou des nécroses sur tige, feuilles et gousses sont collectés à travers différentes régions de l'ouest Algérien (Fig.18).



Figure 18: Position géographique des six zones d'étude et des régions de collectes des échantillons de pois chiche.

Les régions échantillonnées se nomment : Aïn Defla, Relizane, Mostaganem, Aïn Temouchent, Mascara et Sidi Bel Abbas.

Les sites d'échantillonnage sont distants l'un de l'autre d'au moins 10 km. Ils sont représentatifs de six zones de culture de milieu édaphique, topographique et climatique divers.

Les régions côtières, Mostaganem et Aïn Temouchent, se caractérisent par un climat tempéré avec une humidité relative élevée durant toute l'année.

Les régions des plaines intérieure, Relizane, Mascara et Sidi Bel Abbas, se caractérisent par des hivers rudes et des étés secs et chauds, s'étalant du mois de mai jusqu'en octobre. Les montagnes intérieures de la région de Aïn Defla sont caractérisées par une importante pluviométrie et quelque fois de la neige durant l'hiver.

b) Culture et conservation

L'isolement du champignon nécessite un lavage de l'échantillon à l'eau de robinet pour éliminer les poussières du terrain qui s'y déposent. Puis une désinfection préalable du tissu malade est réalisée en essuyant l'échantillon à l'aide d'un coton imbibé d'éthanol à 96 °.

Des fragments de 0,5 cm de longueur sont alors découpés à la limite de la nécrose (front d'attaque du parasite) et déposés pendant 45 à 60 secondes dans une solution d'hypochlorite de sodium (titré à 1 %) afin d'éliminer les saprophytes. Ils sont rincés à l'eau distillée stérile, séchés pendant 5 minutes sur du papier wattman stérilisé au four pasteur, puis déposés sur milieu de culture CSMDA (Tab. 13), à raison de cinq par boîte. Après 7 jours d'incubation à la température ambiante du laboratoire (18 et 25 °C), les colonies intéressantes sont repiquées.

Tableau 13: Composition du milieu CSMDA (Khan *et al.*, 1999)

Poudre de pois chiche	40 g
Glucose	20 g
Agar-agar	20 g
Eau distillée	*q.s.p 1000 ml

*q.s.p. : quantité suffisante pour

Autoclaver le milieu pendant 20 minutes à 120 °C.

Afin d'obtenir une population homogène répondant à la définition de l'isolat selon Semal (1989) la purification est obtenue par culture monospore.

Une suspension de pycnidiospores est diluée à 10^2 conidies/ml puis étalée sur une lame en verre recouverte d'une fine couche de milieu CSMDA à 1,5 % d'agar. Afin d'éviter toute contamination cette lame est disposée à l'intérieur d'une boîte de Pétri stérile (Bouznad, 1989). Après 12 à 16 heures d'incubation à 20 °C, un fragment de gélose contenant une spore unique en voie de germination est prélevée aseptiquement sous une loupe binoculaire et repiquée en boîte de Pétri.

Pour l'identification du pathogène nous nous sommes basés sur les caractères décrits par Punithalingham et Holliday (1972).

Le tableau 14 présente la liste des isolats, leur dénomination (ou codification) ainsi que l'origine géographique de leur obtention.

Tableau 14 : Origine géographique et désignation des isolats de *A. rabiei* du Nord-ouest algérien.

Région (wilaya)	Sites	Codification de l'isolat
Mascara	Rachidia	C1
	El Houaire	C2
	Aïn Fares	C3
Aïn Temouchent	Aïn Temouchent	A1
	Aïn Tolba	A2
	Hammam Bouhdjar	A3
Sidi Bel Abbas	Attouche	B1
	Tessala	B2
Mostaganem	Hessainia	M1, M2
Relizane	Relizane	R1, R2, R3
Aïn Defla	Oued Zeboudj	Z1, Z2, Z3

Après un certain nombre de repiquages, les souches deviennent sénescentes puis soit ne sporulent pas, soit dégènèrent en changeant complètement d'aspect. Aussi, afin de remédier à ces problèmes les souches sont conservées comme suit :

Lorsque les pycnides d'une colonie sont matures, la boîte de Pétri de l'isolat à sauvegarder est submergée de 10 ml d'eau distillé stérile. Au bout de 20 minutes, temps nécessaire au gonflement des pycnides, la colonie est alors raclée avec un scalpel stérile afin de libérer le maximum de conidies. La suspension est ensuite filtrée à travers une mousseline. On prélève alors 500 µl de la suspension sporale qu'on verse dans un tube eppendorf auquel on rajoute 500 µl de glycérol à 50%. Les solutions, ainsi constituées, sont stockées dans un congélateur à -80 °C. Par ailleurs, nos expériences ayant porté sur plusieurs années, aussi certaines précautions s'imposaient pour maintenir la virulence de chaque isolat conservé : une fois par an, chaque isolat est inoculé à une jeune plante d'une lignée de pois chiche sensible à l'antracnose (ILC 1929). Une fois les symptômes apparus, on procède au ré-isolement du pathogène.

1.2. Matériel végétal

1.2.1. Pois chiche (*Cicer arietinum* L.)

a) Origine des lignées

Le matériel végétal est constitué d'un ensemble de lignées utilisées par de nombreux chercheurs travaillant sur l'antracnose du pois chiche dans l'étude de la pathogénicité des isolats de *A. rabiei*.

Onze génotypes de pois chiches (Flip 9393 C , ILC263 , ILC 8068 , ILC 7795 , ILC 249 , ILC 483 , ICC 3996 , ILC 484 , ILC 1929, ILC 482 et ILC 3279) fournis gracieusement par l'ITGC provenant de l'ICARDA et portant code ILC, et de l'ICRISAT portant code ICC. Nous avons également utilisé les trois dernières lignées (ILC 1929, ILC 482 et ILC 3279) pour l'identification des pathotypes du pathogène.

b) Culture des plantes

Les graines des lignées utilisées sont plongées dans une solution contenant l'hypochlorite de sodium à 2 % pendant 5 mn. Elles sont rincées 3 fois avec de l'eau distillée stérile, semées à raison d'une graine par pot (14x7 cm) contenant un substrat de tourbe et de sable de rivière (1/1, v/v). Le sable est préalablement désinfecté par la méthode Bergerac. Les plantes sont soigneusement arrosées, 1 jour sur 2, avec de l'eau de robinet.

1.2.2. *Medicago truncatula*

a) Origine des lignées

Les lignées A17 et F83005.5 de *M. truncatula* ont été multipliées au sein du laboratoire Ecolab (Ensat, Toulouse, France) pour la production de graines.

Les graines de A17 et de F83005.05 sont prégermées selon la technique suivante : Elles sont d'abord scarifiées à l'aide d'un papier de verre, immergées dans de l'eau distillé stérile pendant 30 min, puis déposées sur du papier filtre légèrement imbibé d'eau à l'intérieur de boîtes de Pétri. Les boîtes sont alors scellées avec du parafilm pour éviter toute déperdition d'humidité. Elles sont recouvertes de papier aluminium puis déposées dans un réfrigérateur à +4 °C pendant 4 jours pour lever la dormance, puis 3 à 4 jours à température ambiante de laboratoire jusqu'à la prégermination.

b) Culture des plantes

Les graines prégermées sont semées dans des godets (une graine/godet) de 8 cm de profondeur et de 6 cm de diamètre contenant un mélange de sable de rivière et de terreau (1V/2V). Le sable est désinfecté grâce à deux autoclavages successifs à 120 °C pendant 20 minutes.

Chapitre II

Caractérisation *in vitro* des isolats de *Ascochyta rabiei*

2.1. Caractérisation culturale

L'identification et la caractérisation des isolats obtenus s'est basée sur les caractères morphologiques du champignon et l'aspect cultural (la couleur des colonies, aspect du mycélium, couleur du cirrhe, zonations) sur milieu de culture CSMDA.

2.2. Caractérisation morphologique

Les caractères sont observés sur des thalles âgés de 10 jours et provenant d'un clone (culture monosporelle) de façon à éviter les variations morphologiques qui seraient dues à plusieurs souches. Toutes les cultures sont soumises à des conditions identiques : température de $22 \pm 0,5$ °C, lumière alternée (12h de photopériode).

De nombreuses espèces fongiques ont des exigences générales identiques ou même très proches, mais chaque espèce ne manifeste une croissance et une sporulation optimales que dans des conditions particulières. Ces dernières sont surtout déterminées par la qualité et la quantité des éléments nutritifs présents dans le milieu de culture (Moreau, 1953).

Dans le cas de *A. rabiei* l'utilisation du CSMDA est recommandée. Ce milieu est favorable à sa croissance (Kaiser, 1973; Labdi, 1990). Il soutient aussi une abondante sporulation chez ce pathogène. Aussi, toutes nos études morphologiques et culturales sont réalisées sur ce milieu.

2.2.1. Evaluation de la croissance mycélienne

Des explants circulaires de 5 mm de diamètre sont prélevés à l'aide d'un emporte-pièce stérile à partir d'une colonie jeune de 10 jours. Chaque explant est déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu CSMDA. Le diamètre de la colonie a été évalué en mesurant les diamètres perpendiculaires de la colonie au bout du dixième jour de culture. Pour chaque isolat, nous avons réalisé 6 répétitions. Les boîtes sont mises à incuber à 20 ± 2 °C sous une lumière blanche alternée (une photopériode de 12 heures).

2.2.2. Evaluation de la sporulation

Elle est réalisée sur des cultures du champignon âgées de 10 jours. La technique consiste à verser 10 ml d'eau distillée stérile dans la boîte contenant la colonie du parasite.

Après 20 minutes d'incubation à température ambiante de laboratoire (25 °C), les colonies sont raclées superficiellement à l'aide d'une tige en verre afin de libérer les pycnidiospores.

La suspension de spores est filtrée à l'aide d'une mousseline puis collectée dans un erlenmeyer. A partir de celle-ci nous avons prélevé 3 échantillons de 100 µl. Chaque échantillon est déposé sur une lame de Malassez puis recouvert d'une lamelle. Le nombre de conidies est compté sous microscope optique. Cette étude est réalisée avec 6 répétitions par isolat.

Chapitre III

Essais d'inoculation et suivi des symptômes

3.1. Production de l'inoculum

Pour ce test nous avons utilisé 16 isolats de *A. rabiei* (Tab. 14, p. 59). L'inoculum est produit en boîtes de Pétri sur le milieu CSMDA maintenues à lumière et à température naturelles du laboratoire (20 ± 2 °C).

La suspension de spores de chaque isolat est préparée à partir de cultures âgées de 15 jours. La suspension est filtrée à travers une mousseline. La concentration de l'inoculum est ajustée avec de l'eau distillée stérile à 5×10^5 spores/ml à l'aide d'une cellule de Malassez pour les tests d'inoculation des lignées pois chiche. Du Tween 20 (0,05 %) est ajouté à la suspension de spores en tant qu'agent tensio-actif pour faire adhérer les spores sur les plantes de pois chiche.

Dans le cas des inoculations de *M. truncatula*, l'inoculum de l'isolat utilisé est ajusté à 10^6 spores/ml.

3.2. Etude de la pathogénicité des isolats de *A. rabiei* sur les lignées de pois chiche

3.2.1. Comportement des isolats de *A. rabiei* sur une gamme d'hôtes

3.2.1. L'inoculation

L'essai est effectué dans des boîtes en plastique transparentes (45 x 28 x 35 cm) (voir conditions d'obtention des plantes dans chapitre 1, p.60).

Vingt-quatre plantes de pois chiche sont déposées dans chaque boîte, à raison de 4 plantes par lignée (Fig. 19). L'inoculation est faite au stade levée de la plante (4 à 5 feuilles). L'inoculum est apporté par pulvérisation de spores à l'aide d'un pulvérisateur à piston.

Une humidité relative de 95-100 % est nécessaire à la réussite de l'inoculation (Singh et *al.*, 1981). Les boîtes sont recouvertes chacune d'un couvercle transparent. Les boîtes sont ensuite maintenues en serre à une température de 22 ± 2 °C. Quatre pulvérisations d'eau sont quotidiennement effectuées sur les plantes durant les 72 heures qui suivent l'inoculation. Chaque traitement est réalisé en trois répétitions.



Figure 19 : Disposition des plantes à l'intérieur des boîtes transparentes avant inoculation.

3.2.1.2. Notation de la maladie

Les symptômes des plantes individuelles sont notés 14 jours après l'inoculation selon une échelle de notation de 1 à 9 (Singh et *al.*, 1982) ci-dessous:

- 1 = Pas de symptômes,
- 2 = lésions sur 1–5 % de la plante; hautement résistant,
- 3 = lésions sur 6–10 %; résistante,
- 4 = lésions on 11–15 %; modérément résistante,
- 5 = lésions sur 16–40 %; intermédiaire,
- 6 = lésions sur 41–50 %; modérément sensible,
- 7 = lésions sur 51–75 %; sensible,
- 8 = lésions sur 76–100 %; hautement sensible,
- 9 = plante morte ; Très hautement sensible.

Le degré d'attaque est évalué par un indice d'attaque moyen :

$$IA = \frac{1F1 + 2F2 + 3F3 + 4F4 + 5F5 + 6F6 + 7F7 + 8F8 + 9F9}{N}$$

IA : Indice d'attaque

F : Nombre de plants atteints pour chaque degré dans l'échelle de notation (1 à 9)

N : Nombre total de plantes inoculées.

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

La résistance d'une plante individuelle est définie sur la base d'un score inférieur ou égal à cinq. Les lignées possédant des scores moyens de moins de cinq sur l'échelle de la maladie sont décrites alors comme résistantes (Reddy et Singh 1984; TürKan et Dolar, 2009).

Les scores moyens de la maladie sont soumis à une analyse de variance (ANOVA) afin de détecter les différences significatives entre les lignées et entre les isolats.

3.2.2. Détermination des pathotypes

3.2.2.1. Inoculation

Pour la détermination des pathotypes de *Ascochyta rabiei*, trois cultivars de pois chiches (ILC 1929, ILC 482, ILC 3279) sont utilisés (Udupa et Weigand, 1997). Pour ce faire, deux expériences indépendantes ont été réalisées. Chaque expérience consiste en trois répétitions avec chacune 20 plantes par lignée. Les conditions d'inoculation et de culture des plantes sont les mêmes que celles décrites ci-dessus.

3.2.2.2. Notation de la maladie

L'évaluation de l'infection est réalisée 14 jours après l'inoculation selon l'échelle de Singh et *al.* (1981), allant de 1 à 9 telle que définie ci-dessous :

1= Aucune lésion visible sur les plantes : hautement résistant,

3= lésions visibles sur moins de 10 % de plantes, pas de lésions annulaires sur tige : résistant,

5= lésions visibles sur un maximum de 25 % de plantes, lésions annulaires sur moins de 10 % des plantes, mais peu de dégâts : tolérant

7= lésions sur la plupart des plantes, lésions annulaires sur moins de 50 % des plantes résultant en la mort de quelques plantes : sensible,

9= lésions abondantes sur toutes les plantes, lésions annulaires sur plus de 50 % de plantes, et mort de la plupart des plantes : hautement sensible,

L'indice moyen d'attaque est calculé comme suit :

$$IA = \frac{1F1 + 3F3 + 5F5 + 7F7 + 9F9}{N}$$

3.3. Tests de pathogénicité sur *Medicago truncatula*

3.3.1. Test de pathogénicité sur plantes entières

3.3.1.1. Inoculation

Nous avons choisi l'isolat R3 pour réaliser les tests de pathogénicité sur les lignées de *M. truncatula*. Cet isolat s'est montré moyennement agressif (pathotype II) sur les lignées de pois chiche testées.

Chaque plantule a donc reçu par pulvérisation un volume 2,5 ml de la suspension de 10^6 spores/ml d'*A. rabiei* additionnée de Tween 20 (0,01 %). Les godets, contenant les plantes, sont déposés dans des boîtes en plastique transparent (37,5 x 26 cm), à raison de 20 plantules par boîte et par lignée, selon le dispositif de la figure 20. Les témoins ont reçu une pulvérisation à l'eau distillée stérile additionnée de tween 20. Afin d'assurer une humidité saturante pendant les premières 48 heures suivant l'inoculation, les boîtes contenant les plantules sont fermées à l'aide de couvercles transparents. Les boîtes sont transportées dans une enceinte à 20 °C avec une photopériode de 16 heures (6 néons de 20 W). Ce test est réalisé avec trois répétitions biologiques.



Figure 20: Dispositif expérimental de l'inoculation de plantes entières de *M. truncatula* par *A. rabiei*. En bas, à gauche plantes de la lignée A17 ; en bas, à droite, témoins (T1) de A17. En haut, à gauche, plantes de la lignée F83005.5 ; en haut, à droite leurs témoins (T2).

3.3.1.2. Notation de la maladie

En absence de toute échelle décrivant les symptômes de l'interaction entre *M. truncatula* et *A. rabiei*, nous avons établi une échelle allant de 0 à 4 (Tab. 15). L'évolution progressive des symptômes est estimée tous les 2 jours après la première apparition des

symptômes. Chaque plantule reçoit une note selon son état, d'après l'échelle que nous avons adoptée.

A partir de ces notations, l'intensité de la maladie est évaluée en calculant l'indice d'attaque (IA) tel qu'il a été proposé pour d'autres maladies fongiques (Raynal, 1972).

Cet indice s'obtient comme suit :

$$IA = \frac{\sum \text{des degrés d'attaque}}{\text{Nombre total de platules}}$$

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

Tableau 15: Echelle de notation des symptômes sur plantes entières de *M. truncatula*

Indice de la maladie	Symptômes correspondants
0	Pas de symptômes
1	Enroulement des feuilles vers leur face inférieure
2	pétioles coudés (en forme de canne) ou cassés ; feuilles transparentes et membraneuses ou chlorotiques ; certaines folioles tombent.
3	Plante flétrie
4	Plante morte

3.3.2. Test de pathogénicité sur feuilles détachées de *M. truncatula*

3.3.2.1. Inoculation

Pour réaliser l'inoculation les deux premières feuilles apparues après la première feuille unifoliée, notée 0 (Moreau et *al.*, 2006) sont prélevées à partir d'une plante âgée de 30 jours. Les folioles de la première feuille sont inoculées avec le pathogène pendant que les folioles de la deuxième feuille serviront de témoin. Les folioles de chaque feuille sont découpées à l'aide d'un bistouri puis déposées dans une boîte de Pétri sur un papier filtre stérile et humidifié à l'eau distillé stérile.

Deux gouttes de 5 µl d'une suspension sporale de 10⁶ spores /ml additionnée de Tween 20 à 0,01% sont déposées, à l'aide d'une micropipette, sur la face supérieure, de part et d'autre de la nervure centrale de chaque foliole. Les folioles témoins sont inoculées à l'eau distillée stérile additionnée de Tween 20 à la même concentration. Les boîtes sont scellées avec du parafilm puis déposées dans une enceinte à 20 °C durant 16 heures de photopériode (6

néons de 20 W). Pour chaque lignée, 4 feuilles représentant 4 plantes, soit 12 folioles, sont inoculées avec le pathogène (Fig. 21). Cette expérience est réalisée avec 3 répétitions biologiques.

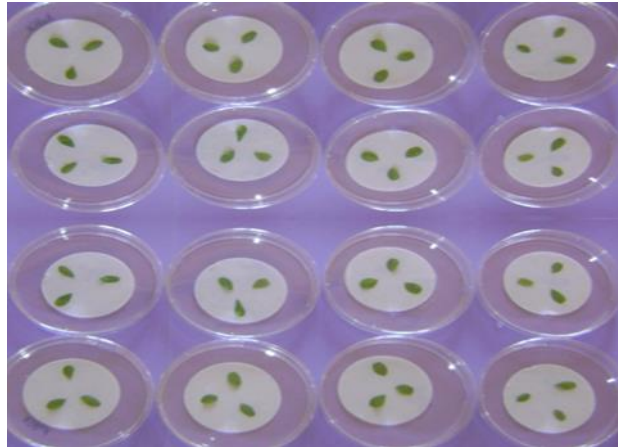


Figure 21 : Dispositif expérimental utilisé pour l'inoculation des feuilles détachées inoculées avec l'isolat R3 de *A. rabiei*. Les quatre boîtes de Pétri de la première ligne : lignée A17 ; en dessous, T1 : témoin A17 ; troisième ligne : lignée F83005.5, en dessous, T2 : témoin de la lignée F83005.5.

3.3.2.2. Notation de la maladie

Les symptômes apparus sont notés selon une échelle individuelle que nous avons établie lors de tests préliminaires sur le comportement des deux lignées (Fig. 22).

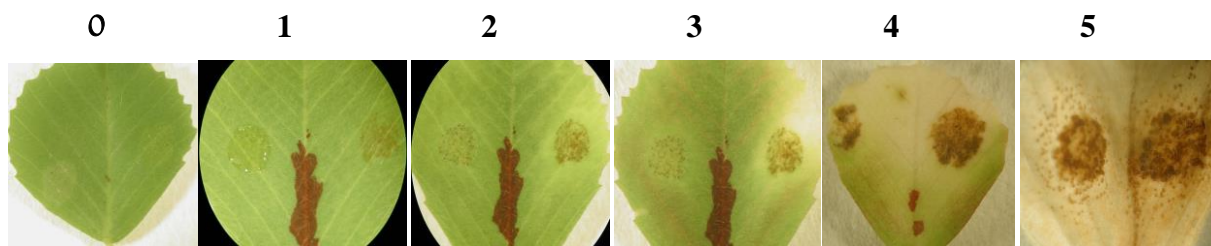


Figure 22: Indices de maladie établis en utilisant des feuilles détachées de *Medicago truncatula* inoculées par *Ascochyta rabiei*. Deux gouttes de 5 μ l (10^6 spores/ml) sont déposées sur chaque foliole, de part et d'autre de la nervure centrale. Les symptômes sont notés comme suit : 0 = pas de symptômes, 1 = 1 à 10 % de la surface foliaire présentant des symptômes et présence de cellules nécrotiques éparées, 2 = 11 à 25 % et apparition d'une région chlorotique autour de la nécrose, 3 = 26 à 50 % , 4 = 51 à 75 % et pycnidies visibles, 5= mort de la foliole.

A partir de ces notations, l'intensité de la maladie est évaluée en calculant l'indice d'attaque (IA) tel qu'il a été proposé pour d'autres maladies fongiques.

Cet indice s'obtient comme suit :

$$IA = \frac{\sum \text{des degrés d'attaque}}{\text{Nombre total de folioles}}$$

Chapitre IV

Méthodes de microscopie

4.1. Mesure des dimensions des conidies des isolats de *A. rabiei*

La variabilité morphologique étant un des critères privilégiés de la diversité des populations (Ayad et *al.*, 2014). Une estimation des dimensions de la longueur et du diamètre des pycnidiospores est réalisée; cette mensuration est effectuée à l'aide d'un microscope photonique préalablement étalonné.

Les pycnidiospores sont prélevées à partir d'une colonie âgée de 10 jours. La suspension conidienne est préparée dans de l'eau distillée stérile et filtrée à travers une mousseline. Pour chaque isolat l'estimation est réalisée sur une moyenne de 100 pycnidiospores.

4.2. Analyse microscopique des folioles de *M. truncatula* inoculées par *A. rabiei*

Des folioles de la première et de la deuxième feuille vraies prélevées sur des plantes âgées de 30 jours sont inoculées avec 2 gouttes de 5 μ l d'une suspension de spores à 10^6 spores /ml puis incubées à 20 °C sous une lumière avec une photopériode de 16 h ($170 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Elles sont alors traitées selon le protocole suivant :

4.2.1. Fixation et décoloration des tissus

Les folioles de *M. truncatula* inoculées sont prélevées à 1, 2, 3 et 4 dpi et découpées en petits carrés de 0,5 cm de côté et limités aux sites d'inoculation. Les carrés de tissus sont trempés dans 5 ml d'un mélange éthanol-chloroforme (3:1). La solution est renouvelée autant de fois que nécessaires jusqu'à obtention d'une décoloration complète des tissus (Fig. 23).

4.2.2. Coloration au bleu d'aniline-lactophénol

Les carrés devenus translucides sont alors trempés pendant 5 minutes dans une solution de bleu d'aniline-lactophénol (annexe 1) afin de colorier les structures du champignon. Ils sont ensuite rincés avec de l'eau distillée stérile (Fig. 24).

4.2.2. Observations microscopiques

Les folioles rincées à l'eau distillée sont déposées entre lames et lamelles avec une goutte d'eau puis observées au microscope d'inversion (DMIRBE, Leica, Rueil-Malmaison, France) avec grossissement x 630, sous huile d'immersion.

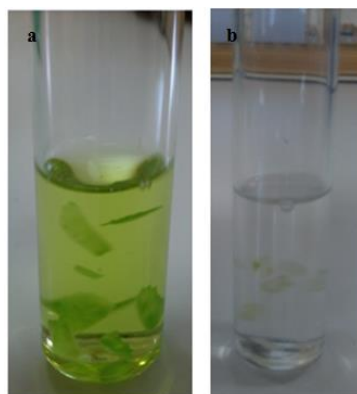


Figure 23: Etapes de décoloration des tissus dans une solution de chloroforme-éthanol.
A gauche tissus en début de décoloration; à droite tissus translucides.

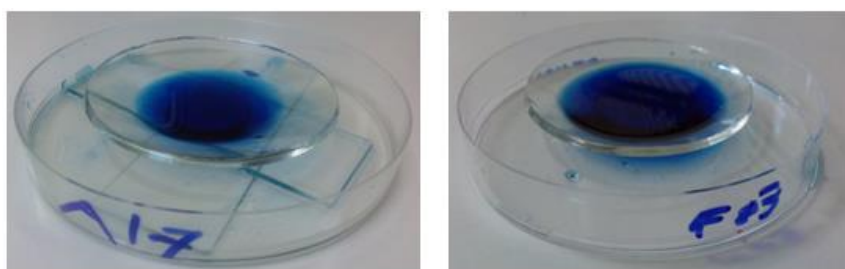


Figure 24 : Coloration des tissus de la lignée A17 et de la lignée F83 avec le bleu d'aniline lactophénol

Chapitre V

Méthodes de biologie moléculaire

5.1. Cultures de *Ascochyta rabiei*

Seize isolats (Tab 14, p. 59) issus de culture monospore sont utilisés dans cette étude. Les isolats sont mis à incuber pendant 10 jours sur milieu CSMDA, à 24 °C, sous lumière alternée (12 h d'obscurité/12 h de lumière). Dix explants mycéliens de 1 cm² chacun, prélevés à l'aide d'un scalpel à la périphérie d'une jeune d'une colonie, ont servi à ensemercer des fioles de 250 ml de milieu de culture PDB (Potato Dextrose Broth, Difco). Les explants ainsi ensemençés sont mis à incuber à 24 °C pendant deux semaines.

Au bout de 7 jours le mycélium recouvre toute la surface du milieu ; il est récupéré par filtration à l'aide d'une pompe à vide, en prenant soin d'éliminer toute trace de résidus de gélose.

Au moment de la filtration, le mycélium est rincé trois fois, séché entre plusieurs couches de papier filtre, enveloppé dans du papier aluminium avant d'être conservé à -80 °C.

5.2. Extraction de l'ADN par la technique au phénol/chloroforme/alcool isoamylique

Il existe plusieurs protocoles d'extraction d'ADN. Nous avons utilisé celui employé sur les cultures de champignons mycorhiziens, adapté à l'extraction de l'ADN provenant des tissus fongiques et végétaux.

Ce protocole repose sur l'utilisation de la protéinase K qui dégrade la composante protéique des parois cellulaires, et inactive les ADNases libérées lors de l'éclatement des cellules. La lyse de la membrane est accomplie par le détergent (CTAB) (annexe 2) contenu dans le tampon d'extraction. Le composant CTAB du tampon d'extraction a pour fonction de piéger les lipides qui constituent la cellule et la membrane nucléaire. Une déprotéinisation de l'extrait est effectuée grâce au mélange phénol/chloroforme.

L'extraction d'acides nucléiques d'un matériau biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité des débris cellulaires.

Les mycéliums, sortis du congélateur, sont broyés dans de l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Le broyat, environ 0,1 g est récupérée dans un tube eppendorf de 1,5 ml auquel on rajoute 650 µl de CTAB. Après homogénéisation du mélange au vortex,

les tubes sont déposés dans la glace. Au mélange ainsi obtenu, on rajoute 10 µl de protéinase K à 20 mg/ml. Après homogénéisation, par quelques mouvements d'inclinaisons, les tubes sont mis en incubation pendant 30 minutes au bain-marie à 65 °C. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation pendant 10 minutes à 13 000 rpm (centrifugeuse Sigma). Le surnageant (environ 600 µl) est transféré dans un tube eppendorf stérile.

En ajoutant 600 µl de mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (12v/12v/1v) au surnageant, on élimine les protéines. Après homogénéisation du mélange et centrifugation (5 min à 13 000 rpm), la phase supérieure contenant l'ADN (environ 400µl) est prélevée puis transférée dans un tube eppendorf stérile. Pour éliminer toute trace de phénol, 600 µl de mélange chloroforme-alcool isoamylique (12v/12v) sont ajoutés, sous hotte, à la phase aqueuse. Les tubes sont agités au vortex pendant 1 minute. Il faut centrifuger les tubes pendant 5 minutes, à 13 000 rpm, pour pouvoir séparer les deux phases. La phase supérieure contenant l'ADN est prélevée puis transférée dans un tube eppendorf stérile. On ajoute alors 1 ml d'Isopropanol-2, pour précipiter l'ADN, puis on mélange en retournant le tube avant de le placer 1 heure à -20 °C. Après une nouvelle centrifugation pendant 20 minutes à 13 000 rpm et à 4 °C, le surnageant est éliminé délicatement et le culot est rincé avec 300 µl d'éthanol à 70 % afin d'éliminer les sels. Après une nouvelle centrifugation (5 minutes à 14 000 rpm), l'éthanol est retiré délicatement et le culot est séché à l'air libre pendant 15 minutes. L'ADN est ensuite solubilisé dans 50 µl de tampon TE8 (annexe 2), la solubilisation est facilitée par incubation à 65 °C pendant 5 minutes. L'ADN est conservé au congélateur à -20 °C.

5.3. Vérification de la concentration et de la pureté de l'ADN

L'ADN, l'ARN, les oligonucléotides et même les mononucléotides peuvent être mesurés directement dans des solutions aqueuses sous forme diluée ou non diluée en mesurant l'absorption A (également définie comme étant la densité optique DO). Si l'échantillon est pur, autrement dit, s'il ne contient pas de quantité significative de contaminants tels que des protéines, du phénol ou de l'agarose, la mesure spectrophotométrique de la quantité de rayons ultraviolets absorbés par les bases, sera une opération facile et précise. La concentration d'acides nucléiques est généralement déterminée par une mesure effectuée à 260 nm contre un échantillon appelé « blanc ».

La concentration en ADN des isolats est évaluée par dosage au spectrophotomètre de type geneQuant. Pro. RNA/DNA calculator. La concentration en ADN dans chaque

échantillon est mesurée à 260 nm, en utilisant une cuve en quartz. Dans ce cas, une unité DO correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin.

L'absorption de la lumière UV à 280 nm est caractéristique des protéines. Le ratio A_{260}/A_{280} est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. Une solution d'ADN est considérée pure lorsque ce ratio est le suivant : $1,8 < A_{260}/A_{280} < 2$.

5.4. Amplification de l'ADN par PCR et étude des régions ITS (Internal Transcribed Spacer ou espaceurs internes transcrits)

5.4.1. Principe de la PCR

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne) (Saiki et *al.* 1985) consiste en une amplification enzymatique *in vitro* d'un segment d'ADN à l'aide d'amorces oligonucléotidiques complémentaires des séquences 5' et 3' du segment à amplifier. La PCR permet d'amplifier spécifiquement une région de DNA double brin de quelques centaines de paires de bases. Ce DNA doit d'abord être séparé en simples brins (dénaturation à 95 °C).

- On ajoute au DNA de départ une large quantité d'amorces (oligonucléotides synthétiques complémentaires des deux extrémités de la région à amplifier) qui vont s'hybrider à 50-60 °C environ avec la séquence complémentaire sur chacun des brins de DNA, et les quatre dNTP qui serviront de substrats.
- On soumet le tout à l'activité d'une Taq *polymerase* qui synthétise, à 72 °C, un brin complémentaire à partir du côté 3'OH de l'amorce hybridée. On obtient quatre brins de DNA.
- On recommence à dénaturer ces 4 brins, puis on les laisse s'hybrider avec les amorces (toujours en excès) et la polymérase entre en action pour aboutir à 8 brins de DNA.
- On recommence à dénaturer ces 8 brins, puis on les laisse s'hybrider avec les amorces (toujours en excès) et la polymérase entre en action pour aboutir à 16 brins de DNA.
- Et ainsi de suite 35 fois, ce qui aboutit à 34359738368 brins de DNA (34 milliards), ce qui représente une quantité suffisante pour étudier le fragment de DNA amplifié (Annexe 3).

5.4.2. PCR et conditions de réalisation

Parmi les approches moléculaires en systématique des champignons, nous avons choisi celle basée sur l'analyse des séquences de l'ADN ribosomal. L'unité ribosomique, présente dans le génome de tous les organismes, est répétée en tandem chez les champignons.

Les séquences de cette unité comprennent à la fois des régions variables et des régions conservées. Ainsi, la région ITS de l'ADN ribosomique est une zone assez conservée à l'intérieur d'une même espèce fongique mais elle est très variable d'une espèce à l'autre et constitue donc un bon outil taxonomique à l'échelle de l'espèce.

Nous avons choisi d'amplifier par PCR la région ITS avec deux amorces universelles ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') largement décrites par White et *al.* (1990).

La composition du mélange réactionnel (volume réactionnel de 25 µl) est la suivante :

Solution stock	Volume	Concentration finale
Tampon Taq 10x	2,5 µl	1x
Mg Cl ₂ 50 mM	1,25 µl	2,5 mM
dNTP mix 10 mM	0,5 µl	0,2 mM
Amorce ITS1 10 µM	0,5 µl	0,2 µM
Amorce ITS4 10 µM	0,5 µl	0,2 µM
ADN 5 ng/µl	10 µl	50 ng quantité
Taq polymerase	0,25 µl	1 unit. quantité
Eau UHQ autoclavée	9,5 µl	q.s.p.* 25 µl
Volume final	25 µl	-

*q.s.p. : quantité suffisante pour

Les conditions de PCR et l'amplification sont réalisées dans le thermocycleur selon le programme de Saiki et *al.* (1988).

Etape	Température	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	94 °C	5 min	1
Dénaturation	94 °C	1 min	38
Hybridation	50 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	1
Extention finale	72 °C	10 min	
Stockage (option)	4 °C	variable	

5.4.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

La taille et la pureté des fragments d'ADN amplifiés sont vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose (1,4 %) dans 40 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA (annexe 2) et un tampon pH 8.0 TAE et bromure d'ethidium (0,1 µg/ml). Le gel est déposé dans une cuve à électrophorèse,

et recouvert par le Tampon TAE (annexe 2). Dans chaque puits, nous avons déposé 7 µl de chaque mélange additionnée de 3 µl de tampon de charge. Le premier puits est réservé au marqueur de 1 kb. La migration de l'ADN est faite sous une tension de 80 volts pendant 2 h 30 mn.

Le BET étant un cation qui s'intercale entre les bases de l'ADN, le complexe ion éthidium/ BET est fluorescent sous UV. Ainsi les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés et photographiés.

5.4.4. Séquençage des régions ITS

Après vérification de la qualité de l'ADN par électrophorèse, les produits de PCR peuvent alors être séquencés. Le séquençage des fragments est réalisé par la plate-forme Beckman Coulter Genomics (Royaume Uni). Les séquences obtenues sont ensuite analysées par comparaison avec des séquences existant dans les bases de données (GenBank) à l'aide du programme Blast du serveur NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

5.5. Exploration du polymorphisme par les marqueurs microsatellites

Les microsatellites ou répétitions de séquences simples (SSR) sont des motifs en tandem de 1 à 6 bases réparties dans le génome eucaryote, nécessitant de petites quantités d'ADN et sont l'outil relativement pas cher et facile à explorer la diversité génétique.

Quatre amorces SSR sont utilisées :

M13 (GAGGGTGGCGGTTCT), (ATC)₅ et (GAA)₅ (TGTC)₄ sont utilisés pour amplifier l'ADN génomique de 16 isolats de *A. rabiei*.

Pour l'amorce M13 la composition du mélange réactionnel (volume réactionnel de 25 µl) est la suivante :

Solution stock	Volume	Concentration finale
Tampon Taq 10x	2,5 µl	1x
Mg Cl ₂ 50 mM	1,25 µl	2,5 mM
dNTP mix 10 mM	0,5 µl	0,2 mM
Amorce M13 10 µM	0,5 µl	0,2 µM
ADN 5 ng/µl	10 µl	50 ng quantité
Taq polymerase	0,25 µl	1 unit. quantité
Eau UHQ autoclavée	10 µl	q.s.p.* 25 µl
Volume final	25 µl	-

*q.s.p. : quantité suffisante pour

La réaction d'amplification proprement dite est effectuée grâce à différents cycles de températures réalisés sur un thermocycleur (GenenAmp.PCR system 9700). Nous avons utilisé les mêmes programmes que ceux réalisés pour l'amplification des régions ITS.

Pour les amorces restantes ((ATC)₅, (GAA)₅ et (TGTC)₄), la composition du milieu réactionnel est la suivante :

Solution stock	Volume	Concentration finale
Tampon Taq 10x	2,5 µl	1x
Mg Cl ₂ 50 mM	1 µl	2 mM
dNTP mix 10 mM	0,5 µl	0,2 mM
Primer 10 µM	2,5 µl	1 µM
Taq polymerase	0,25 µl	1 unité
ADN 15 ng/µl	10 µl	150 ng quantité
Eau UHQ autoclavée	8,25 µl	q.s.p.* 25 µl
Volume final	25 µl	-

*q.s.p. : quantité suffisante pour

La réaction d'amplification proprement dite est effectuée grâce à différents cycles de températures réalisés sur un thermocycleur (GenenAmp.PCR system 9700) réglé suivant les programmes suivants :

Etape	Température	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	94 °C	1 min	1
Dénaturation	94 °C	30 s	37
Hybridation	*TH	1 min	
Elongation	72 °C	1 min	
Extention finale	72 °C	2,5 min	
Stockage (option)	4 °C	variable	1

*TH : température d'hybridation (37 °C pour (ATC)₅ et (GAA)₅ ; 45 °C pour (TGTC)₄).

Pour l'électrophorèse les produits PCR sont séparés dans un gel d'agarose à 1,4 %, dans 40 mM de Tris-acétate, 1 mM EDTA pH 8,0 (TAE) tampon (Sambrook et *al.*, 1989). Les gels ont été colorés avec du bromure d'éthidium (0,1 µg / ml), visualisés sous lumière UV et photographiés en utilisant Gel Doc 2000 system. Un marqueur d'ADN de 1 kb et 100 pb

(Invitrogen, France) sont utilisés comme référence pour permettre une comparaison entre les bandes amplifiées.

5.6. Identification des Mating type

Il existe deux protocoles d'identification des mating type pour *Ascochyta rabiei* :

- La technique d'inoculation des tiges de pois chiche (Kaiser et Kusmenoglu, 1997). *Ascochyta rabiei* est un champignon hétérothallique. Pour identifier des groupes de compatibilité sexuée, la suspensions de spores d'un chaque isolat (1×10^6 spores par ml) est mélangée à volume égal avec une suspension de spores du testeur de type sexuel, soit MAT1-1 ou MAT1-2. Des tiges de pois chiche imprégnées de cette suspension sont conservées au froid. Le développement et la maturation des pseudothèces nécessitent entre 1 et 2 mois. Cette procédure est longue et pénible.
- La technique PCR qui permet grâce à des amorces d'avoir des résultats plus rapidement. C'est cette dernière que nous avons utilisé.

5.6.1. PCR et conditions de réalisation

La technique PCR développée par Barve et *al.* (2003) est utilisée pour identifier rapidement les groupes de Mating type de *A. rabiei* (Rhaim et *al.* 2007). C'est cette dernière que nous avons utilisée.

Le type mating type de chaque isolat a été déterminé en utilisant le test de PCR spécifique MAT. Une amorce MAT1-1 spécifique SP21 (ACAGTGAGCCTGCACAGTTC), une amorce spécifique MAT1-2 Tail 5 (CGCTATTTTATCCAAGACACACC), et une amorce spécifique de la région flanquante Com1(GCATGCCATATCGCCAGT) ont été combinés à des concentrations égales dans une seule réaction de PCR.

Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume de 25 μ L contenant 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, et 1 unit *Taq* DNA polymérase, 0,4 mM de chaque amorce ; la concentration de l'ADN est de 4 μ g/mL.

Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur thermique avec une étape de dénaturation initiale de 1 min à 94 °C, suivi de 45 cycles de 30 s à 94 °C, 1 min à 72 °C, avec une extension finale pendant 2 minutes et 50 secondes à 72 °C. La température d'hybridation est de 58 °C. L'ADN d'isolats de *A. rabiei* de types sexuels connus et utilisé comme témoin est obtenu grâce à la collaboration de Sabine Banniza, docteur à l'Université de la Saskatchewan, Canada).

5.6.2. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits amplifiés ont été séparés dans un gel d'agarose à 1,4 % puis colorés avec du bromure d'éthidium (0,1 µg / ml), visualisés sous lumière UV et photographiés en utilisant le Gel Doc 2000 system. Un marqueur d'ADN 100 pb (Invitrogen, France) de taille standard est utilisé pour la lecture des tailles des bandes d'ADN amplifiés.

5.7. Etude de l'expression des gènes de défense de *M. truncatula*

Pour étudier des mécanismes de défense potentiellement mis en place par les plantes de *M. truncatula*, nous avons essayé de cibler les gènes qui ont été induits lors de l'interaction de *M. truncatula* avec *R. solanacearum* dans une étude préliminaire effectuée au laboratoire Symbiose et pathologie des plantes de l'ENSAT de Toulouse.

5.7.1. Inoculation des feuilles détachées

Des jeunes folioles des lignées A17 et F83005.5 sont récoltées en conditions identiques aux travaux décrites ci-dessus, au moment de l'inoculation (T0) et à 1, 2 et 3 dpi. Ces moments correspondent aux étapes dans lesquelles le pathogène est mis en contact de la foliole, à la germination des conidies et leurs pénétrations dans les tissus de l'hôte, et au début de l'apparition des cellules nécrosées.

A l'instar de l'expérience réalisée pour la notation des symptômes sur feuilles détachées, deux feuilles sont prélevées à partir de chaque plante. Les folioles d'une feuille seront inoculées avec le pathogène pendant que les folioles de l'autre feuille serviront de témoin. Rappelons aussi que les feuilles (lignée F83005.5 et lignée A17) sont prélevées à partir de plantes âgées de 30 jours. Quatre répétitions sont réalisées, chacune a trois folioles, soit douze répétitions techniques pour chaque lignée.

Les folioles de chaque feuille sont prélevées à l'aide d'un bistouri puis sont déposées dans une boîte en plastique carrée (20 x 20 cm) contenant un papier filtre stérile humidifié, sur lequel nous avons préalablement tracé, au crayon, un cadriage à 16 carrés. Dans chaque carré, nous avons disposé trois folioles de la même plantule. Deux gouttes de 5 µl d'une suspension sporale de 10⁶ spores /ml additionnée de Tween 20 à 0,01 % sont déposées, à l'aide d'une micropipette, sur la face supérieure, de part et d'autre de la nervure centrale de chaque foliole. Les folioles témoins sont inoculées à l'eau distillée stérile additionné de Tween 20 à 0,01 %. Les boîtes de cultures sont ensuite placées en chambre de culture à 20 °C avec une photopériode de 16h à 20 °C. Trois répétitions biologiques indépendantes sont réalisées.

5.7.2. Extraction de l'ARN

Les folioles ont été récoltées au moment de l'inoculation T0, à 1, 2 et 3 dpi à partir des feuilles inoculées et non inoculées. Elles sont emballées dans du papier aluminium et déposés dans un bac contenant de l'azote liquide. Afin de minimiser la variation de l'expression des gènes chez les plantes individuelles de chaque lignée, les folioles recueillies à partir de 4 plantes individuelle ont été homogénéisées pour l'extraction de l'ARN. Les feuilles inoculées et les feuilles témoins sont mises dans un congélateur et conservés -80 °C jusqu'à leur utilisation.

L'ARN total a été isolé de trois répétitions indépendantes, en utilisant le réactif au Trizol (Invitrogen). Il a été extrait à partir de feuillettes infectées et non infectées, à 0, 1, 2 et 3 dpi.

Les échantillons sont broyés dans de l'azote liquide en utilisant un pilon et un mortier précédemment refroidis dans de l'azote liquide.

La poudre végétale fine ainsi obtenue est répartie uniformément dans 3 tubes eppendorf (environ 250 mg par tube). Ces derniers sont immédiatement plongés dans l'azote liquide puis conservés dans un congélateur à -80 °C.

Les étapes suivantes ont été réalisées sous la hotte chimique et en portant des gants.

Pour l'extraction, 1ml de Trizol (Invitrogen) a été ajouté à 250 mg de tissu broyé. Le tout a été mélangé au vortex pendant 15 secondes puis incubé pendant 15min à 37 °C pour permettre la dissociation des complexes nucléoprotéiques. Après cela, 200 µl de chloroforme sont ajoutés dans le tube puis le tout est mélangé au vortex pendant 15 s. Une centrifugation de 15 minutes à 4 °C à 12000 g a permis la séparation des phases aqueuse et organique. La phase aqueuse a été transférée dans un tube eppendorf propre.

Pour la précipitation de l'ARN, 500 µl d'isopropanol pour 250 mg de tissu broyé ont été ajoutés puis mélangés par inversion du tube, 3 à 4 fois manuellement avant incubation pendant 15 min dans la glace. Une centrifugation de 20 min à 4 °C et à 8000 g a été réalisée avant d'éliminer le surnageant par pipetage. Le culot est repris alors dans 1ml d'éthanol 70 % (froid) (30 % DEPC), puis centrifugé 10 min à 4 °C à 8000 g, puis séché sous hotte par ouverture des tubes (dans la glace) et repris dans 30 µl d'eau ultra-pure (diethylpyrocarbonate, SIGMA) préalablement autoclavée.

L'ARN est alors quantifié en utilisant un Nanodrop Spectrophotometer ND-100 (Thermo Fisher Scientific) et sa qualité vérifiée en utilisant l'Agilent 2100 BioAnalyser avec des puces RNA 6000 Nano Chips (Agilent Technologies) (annexe 4).

5.7.3. qRT- PCR pour l'étude de l'expression de gènes

La reverse transcriptase (RT), ou transcriptase inverse, est une enzyme qui transcrit l'information génétique de l'ARN en ADN (appelé aussi ADNc). Elle est notamment très utilisée par les rétrovirus et les rétrotransposons. Cette propriété est très utile pour quantifier des ANR, parfois présents en infime quantité, en utilisant l'ADNc produit par la RT pour effectuer une PCR.

5.7.3.1. Synthèse de l'ADNc

La rétrotranscription (RT-PCR) permet d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN grâce à la Reverse transcriptase.

Pour la synthèse des ADN complémentaires nous avons utilisé le kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega). 1 µg d'ARN traités à la DNase est mélangé avec 1 µl d'OligodT15 puis incubé à 70 °C pendant 5 min avant incubation dans la glace pour au moins 5 min. Chaque tube est spiné pendant 10 secondes pour collecter le condensat et maintenir le volume initial. Les tubes sont disposés dans la glace jusqu'à ce que le mix de la réaction de transcription inverse (Tab. 16) soit ajouté.

Tableau 16: Mélange réactionnel pour la transcription inverse

Produits	Volume unité (µl)
H2O UHQ (au volume final de 15µl)	x µl
imProm-II™ 5x Reaction buffer	4 µl
MgCl ₂ (concentration finale 1,5-1,8)	1,2-6,4 µl
dNTP Mix (concentration finale 0,5mM chaque dNTP)	1 µl
Recombinant RNasim Ribonuclease inhibitor (optionnel)	20 unités (0,5 µl)
imProm-II™ Reverse transcriptase	1 µl
Volume final	15 µl

Chaque solution du tube contenant 15 µl du mélange réactionnel est mélangée avec le tube initial contenant l'échantillon d'ARN, préalablement maintenu dans la glace, pour obtenir un volume final de 20 µl. Tous les tubes contenant les échantillons sont placés dans le

thermocycleur réglé à 25 °C pendant 5 minutes, 42 °C pendant 1 heure (extension), 70 °C pendant 15 minutes, 4 °C à l'infini.

5.7.3.2- PCR quantitative

Pour les réactions de q-PCR, la machine ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems), le Kit Power SYBR® Green kit (Applied Biosystems) et des plaques à 384 puits ont été utilisés. Deux réplifications techniques sont réalisées pour chaque échantillon. Le volume réactionnel est de 10 µl soit 5µl de Power SYBR® Green, 1ng d'ADNc et 5µM de chaque primer en suivant les conditions d'amplification suivantes : 50 °C pendant 2 mn, 95 °C pendant 10 min, 40 cycles de 95 °C pendant 15 s et 60 °C pendant 1 mn. Toutes les séquences utilisées pour les amplifications sont présentées dans le tableau 17.

Tableau 17: Amorces utilisées pour les PCR

Codes	Gènes	Séquences
Monts	EF1- α	F : GTTGTGTAACAAGATGGATGC R : GAGTCAAGGTTGGTGGACCT
MFJ	PR1	F : CAGTTTCGCCTTGTTTCTGTTACTT R : TTGGGATATAACTGGCACTCACA
Gentz	PR5	F : TGCCTTAGCTTTGCATTCTT R : AATTTCCGCTGAGTTCGTTG
Medtg2g035100	PR10	F : AGCATCACCTTTGGTAGCGGATT R : AGCATCACCTTTGGTAGCGGATT
TC121286	Pi20	F : CACACAATACACACAGCAAAAATACAGTAA R : GCCCAAATCAGACGAGGTATGT
TC106842	Chitinase	F : AAGAGGACAGGATGGAAGAGTG R : TAGCTAGGTGTCATGGAGTTG
Touen	B-1-3-Glucanase	F : CAAATTGGGTCCAAAAATATGTGAC R : GCACCATCATTGGGTGGATATGAAG
TC113890	PAL	F : TCGGCGGTGAGACACTTACC R : ACACCACTATCATGGAAGCAA
Touen	Flavone synthase	F : CAGCAGGAACAGACACAACATCA R : TGAAGGGTTGTTTCATTAGCTCAAC
MFJ	Chorismate synthase	F : TTCGATGTCCAGACCCTGAAT R : TCACTCGGACAGCATCAATAGC

Les données sont analysées avec le logiciel SDS 2.2.2 (Applied Biosystems). La variation de l'expression du gène (Fold) a été déterminée par la méthode de Livak et Schmittgen (2001) qui permet de calculer la valeur de $\Delta\Delta C_t$ pour chaque gène étudié. Cette valeur est calculée de la façon suivante :

Ctg,i = Ct du gène en condition d'inoculation par *A. rabiei*.

Ctg,t = Ct du gène en condition d'inoculation par l'eau (témoin).

Ctr,i = Ct du gène de référence (EF1 α) en condition d'inoculation par *A. rabiei*.

Ctr,t = Ct du gène de référence (EF1 α) en condition d'inoculation par l'eau (témoin).

$\Delta\text{Ct } i = \text{Ctg},i - \text{Ctr},i$

$\Delta\text{Ct } t = \text{Ctg},t - \text{Ctr},t$

$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct } i - \Delta\text{Ct } t$

Le niveau d'induction est égal à $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Si cette valeur est supérieure à 2, le gène est induit; si elle est inférieure à 1/2 le gène est réprimé.

Chapitre VI Analyses statistiques

6.1. Expériences sur l'interaction *A. rabiei/Cicer arietinum*

Les analyses de corrélation (croissance mycélienne-sporulation des isolats et sporulation-agressivité) et leurs courbes sont réalisées grâce au logiciel Stat Box 6.4. D'autre part, pour l'ensemble des expérimentations effectuées, les analyses statistiques sont réalisées à l'aide de ce logiciel. Les résultats de l'analyse *ANOVA* sont donnés dans le texte sous forme de tableaux statistiques montrant la significativité ou la non significativité des facteurs étudiés. Les principaux résultats du test de Newman-Keuls figurent sur les histogrammes ou encore dans les tableaux de moyennes. Pour ne pas encombrer le texte, nous avons mis en annexe tous les tableaux de Newman-Keuls.

L'étude sur la sporulation des isolats de *A. rabiei* est effectuée grâce au logiciel SPSS 11.5.

6.2. Expériences sur l'interaction *Ascochyta rabiei/Medicago truncatula*

Les effets des génotypes (A17 et F83005.5), des répétitions biologiques et de leurs interactions ont été identifiés par analyse de variance (*ANOVA*) avec la procédure de modèle du logiciel Stat Box 6.4.

Pour chaque analyse de variance, la comparaison des moyennes a été effectuée avec la différence la moins significative. Pour la comparaison des moyennes nous avons utilisé le test de Newman-Keuls.

En vue de s'assurer de la reproductibilité de nos expériences et de la fiabilité de nos résultats, nous avons réalisé dans les mêmes conditions trois expériences indépendantes, c'est ce que nous appelons des répétitions biologiques. Nous avons alors réalisé, quand c'est nécessaire, trois répétitions biologiques.

Les résultats de l'analyse *ANOVA* sont donnés dans le texte, sous forme de tableaux statistiques montrant la significativité ou la non significativité du facteur étudié. Les principaux résultats du test de Newman-Keuls figurent sur les histogrammes ou les tableaux de moyennes. Les tableaux d'analyse du test de Newman-Keuls se trouvent dans les annexes.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSIONS

Chapitre I

Variabilité culturelle et morphologique des isolats de *Ascochyta rabiei*

1.1. Résultats

L'objectif de cette étude porte sur la caractérisation et l'identification de 16 isolats de *Ascochyta rabiei* dans différentes régions de culture de pois chiche du nord-ouest algérien. Cette analyse porte sur leurs caractères morphologiques, culturels et la recherche de leurs corrélations avec la pathogénicité et/ou le profil génétique des isolats.

1.1.1. Variabilité culturelle de *Ascochyta rabiei* sur milieu de culture CSMDA

1.1.1.1. Variation de la pigmentation des colonies et de la couleur du cirrhe

Après 10 jours de culture sur CSMDA, les colonies présentent des pigmentations différentes. Elles sont d'abord crémeuses, puis prennent des couleurs extrêmement variées. La couleur du thalle résultant de cette pigmentation est variable selon l'isolat. Le mycélium de la plupart des isolats est vert olive ou gris souris et variant dans son intensité à la marge des colonies. Celles-ci présentent différentes nuances de gris et blanc avec une coloration distincte dans le centre. La colonie de l'isolat R2 est marron avec un centre brun foncé (Fig. 25, Tab. 18).

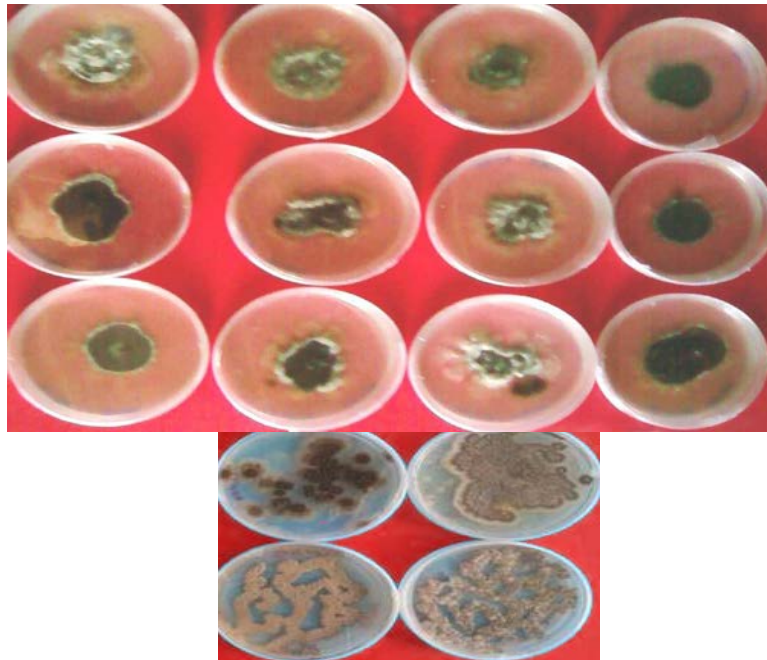


Figure 25 : Aspects culturels des isolats de *Ascochyta rabiei* sur milieu de culture CSMDA, sous une température de 20 ± 2 °C et 12 heures de photopériode (de gauche à droite, M2 ; M1 ; B2 ; B1 ; Z1 ; A3 ; A2 ; A1 ; Z2 ; C3 ; C2 ; C1 ; Z3 ; R1 ; R2 ; R3).

La couleur du Cirrhe est variable selon l'isolat. Elle est blanc sale dans isolat C2 et M1, brun pour les isolats M2, B1, B2, A2, A3, C1 et C3 et brun clair pour les autres isolats.

Tableau 18: Caractéristiques morphologiques des isolats de *A. rabiei* du nord-ouest algérien après 10 jours de culture sur CSMDA à $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Isolat	Couleur de la colonie	Couleur du Cirrhe
C1	Gris souris	Brun
C2	Vert olive	Blanc sale
C3	Vert olive	Brun
A1	Vert olive	Saumon
A2	Vert clair	Brun
A3	Gris souris	Brun
B1	Vert olive	Brun
B2	Vert olive	Brun
M1	Vert olive	Blanc sale
M2	Gris souris	Brun
R1	Gris souris	Brun clair
R2	Brun foncé	Brun clair
R3	Brun foncé	Brun clair
Z1	Brun	Brun clair
Z2	Gris souris	Brun clair
Z3	Vert olive	Brun clair

1.1.1.2. Zonations des colonies

Pour certains isolats tels que R1, R2, R3, A2, A3, M1, M2, B1, B2, Z1, Z2 et Z3. Les colonies forment des zonations. Le phénomène apparaît comme un zonage des bandes de mycélium sporulantes en alternance avec des bandes de mycélium avec peu de sporulation. Ces zones évoluent en cercles concentriques (Fig. 26). Cependant ce caractère n'est pas généralisé à tous les isolats, car absent chez A1, C1, C2 et C3 n'en forment pas.

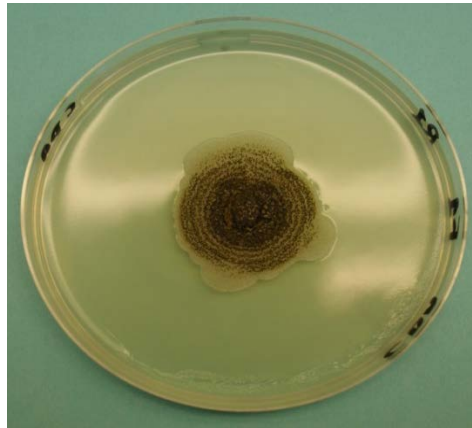


Figure 26 : Exemple de zonation (cas de l'isolat R1) sur milieu de culture CSMDA.

1.1.2. Variabilité morphologique sur milieu CSMDA

1.1.2.1. Variation du diamètre des colonies et de la croissance mycélienne

Le diamètre moyen des colonies des 16 isolats après 10 jours de culture à 20 ± 2 °C varie entre 30,75 mm pour l'isolat B2 et 54,5 mm pour l'isolat C1 (Tab. 19). En comparant le diamètre moyen par région, il s'avère que les isolats issus de la région de Aïn Temouchent ont la valeur moyenne la plus faible (32,96 mm) en revanche ceux de la région de Mascara montrent la moyenne la plus importante (46,61 mm).

La croissance mycélienne augmente lentement lorsque la température est supérieure à 25 °C.

L'analyse de variance de la croissance mycélienne révèle des différences significatives entre les isolats (Tab. 19). Le test de Newman-Keuls au seuil de 5 % fait ressortir 11 groupes homogènes (annexe 5).

Tableau 19: Analyse de variance pour la croissance mycélienne des isolats, après 10 jours de culture sur milieu CSMDA.

Source de variation	S.C.E	^a DDL	^b C.M.	TEST F
Isolats	4024,139	15	268,276	463,294*
Erreur	46,325	80	0,579	

^aDDL : Degré de liberté

^bCM: Carré moyen

* : significatif à 0,05

1.1.2.2. Dimension des conidies

Les mensurations conidiennes des isolats de *A. rabiei* ont porté sur la longueur et la largeur. La première varie entre 5,2 et 17,2 μm , selon l'isolat; alors que la seconde s'étale entre 2,4 et 6,7 μm . Les mensurations des conidies de chaque isolat ainsi que leurs limites supérieures et inférieures sont indiquées dans le tableau 20. Notons que l'isolat C3 possède la plus grande moyenne. L'analyse de variance pour la mensuration des conidies montre une différence hautement significative entre les isolats étudiés (Tab. 21 et 22). Le test de Newman et Keuls au seuil de 5 % permet de classer les isolats selon la longueur et la largeur des conidies en 6 groupes homogènes (Annexe 6), indépendamment des régions.

Tableau 20: Diamètre moyen des colonies de *A. rabiei* et dimensions des conidies, après 10 jours d'incubation sur milieu CSMDA, à 22 ± 2 °C.

Isolats	Diamètre de la colonie (mm)	Taille des conidies (μm)		
		Intervalle de mesure	Largeur moyenne	Longueur moyenne
C1	54,5 \pm 0,77	(3,12-5,7) x (5,98-14,2)	4,72	10,51
C2	44,66 \pm 0,52	(3,4-5,6) x (6,2-13,8)	4,91	11,17
C3	40,67 \pm 1,08	(2,6-6,7) x (7,8-15,6)	5,54	12,14
A1	32 \pm 0,63	(2,4-6,4) x (6,8-15,6)	5,24	11,87
A2	33,08 \pm 0,20	(3,3-6) x (6,2-15)	4,97	10,73
A3	33,82 \pm 1,44	(2,6-6,5) x (7,54-13,98)	4,36	10,47
B1	48,58 \pm 1,36	(2,8-6) x (6,2-16)	4,15	10,39
B2	30,75 \pm 0,42	(3-6,4) x (6,4-14)	4,59	9,59
M1	42 \pm 1,22	(2,85-5,72) x (5,98-13,2)	4,02	10,17
M2	35,34 \pm 0,41	(2,86-5,98) x (6-14,3)	3,98	10,11
R1	32,17 \pm 0,26	(3,12-5,98) x (6-17,2)	4,45	10,14
R2	33,42 \pm 0,49	(3,6-5,8) x (6,2-14,2)	4,64	0,99
R3	41,74 \pm 0,52	(3,6-6) x (6,24-13,6)	4,54	10,31
Z1	38,17 \pm 0,52	(3-5,98) x (6,24-13,6)	4,49	11,53
Z2	34,26 \pm 0,76	(3,12-5,72) x (5,2-15,08)	4,45	11,35
Z3	38 \pm 0,32	(3,64-5,8) x (6-15,15)	4,67	11,16

Tableau 21: Analyse de variance pour la longueur des conidies

Source de variation	S.C.E	^a DDL	^b C.M.	valeur F
Isolats	621,03	15	41,402	10,367*
Erreur	6326,146	1584	3,994	

* significatif à 0,05

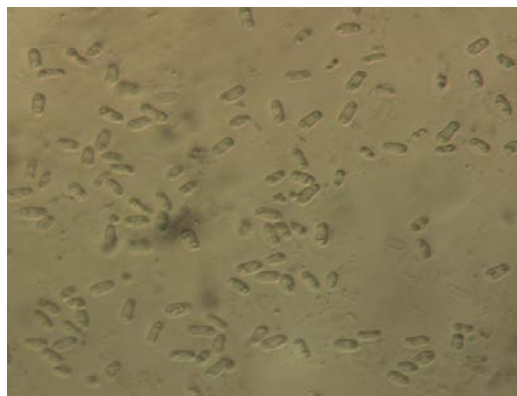
Tableau 22: Analyse de variance pour la largeur des conidies

Source de variation	S.C.E	DDL	C.M.	valeur F
Isolats	11,797	15	0,786	20,252*
Erreur	5,592	144	0,039	

* significatif à 0,05

Les pycnides observées sont de forme sphérique ou en forme de poire, contenant de nombreuses spores hyalines unicellulaires (pycnidiospores) et occasionnellement bicellulaires naissant ou conidies sur de courts conidiophores intégrés dans une masse mucilagineuse.

Pour chaque isolat nous avons compté entre 3 à 4 % de spores qui présentent une cloison (bicellulaires), les autres étant monocellulaires. Les conidies sont hyalines droites, cylindriques et arrondies à l'une ou aux deux extrémités (Fig. 27).

**Figure 27:** Exemple de conidies de *Ascochyta rabiei* (M2) (x400) (Originale, 2016).

1.1.2.3. Variation de la sporulation

Les mesures de la sporulation des 16 isolats sont représentées dans la figure 28. Le nombre de conidies varie de $0,13 \times 10^7$ / ml (C2 et C3) à $2,52 \times 10^7$ / ml (R3). La sporulation est variable selon les 16 isolats, en reflétant une différence hautement significative (Tab. 23, Annexe 7). Cela indique un déterminisme génétique pour ce caractère.

L'origine des isolats semble avoir une certaine influence sur la sporulation. Lorsque des valeurs moyennes pour la sporulation sont calculées pour les isolats de la même région, il semble qu'il y ait aussi un effet région d'origine. Les isolats de Mascara (C1, C2, C3) et Mostaganem (M1, M2) produisent moyennement peu de spores ($0,242 \times 10^7$ sp / ml) et ($0,279 \times 10^7$ sp / ml), respectivement, alors que ceux de Aïn Temouchent (A1, A2, A3), Aïn Defla (Z1, Z2, Z3), Sidi Bel Abbes (B1, B2) et Relizane (R1, R2, R3) produisent des quantités relativement plus élevées avec des valeurs moyennes de $0,947 \times 10^7$ sp / ml, $1,309 \times 10^7$ sp / ml, $1,616 \times 10^7$ sp / ml, et $2,049 \times 10^7$ sp / ml (Fig. 28).

Tableau 23: Analyse de variance pour la sporulation des isolats de *Ascochyta rabiei* après 10 jours d'incubation à 20 ± 2 °C, sur milieu CSMDA.

Source de variation	DDL	CM	Valeur de F
Isolats	15	4,08	912,12**
Erreur	80	0,004	

**significatif à 0,01

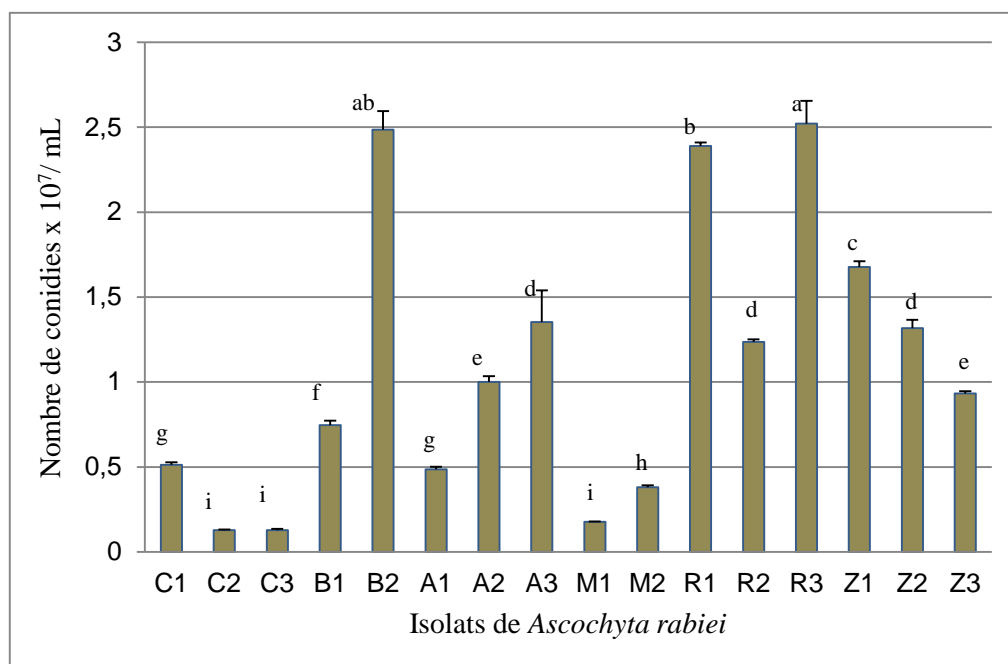


Figure 28: Sporulation des isolats de *Ascochyta rabiei* mesurée après 10 jours d'incubation sur CSMDA, à 22 °C et 12 h de photopériode. Les valeurs sont calculées à partir de 6 répétitions.

L'effet région est hautement significatif à $p < 0,001$ (Tab. 24) et permet une classification des isolats en 4 groupes (Tab. 25). Les isolats de Sidi Bel Abbes et de Aïn Defla figurent dans le même groupe, ceux de Mostaganem et de Mascara dans un autre groupe. Une corrélation inverse entre la croissance du mycélium et la sporulation est observée avec une valeur de $R = -0,42$ à $p = 0,05$ (Fig. 29, annexe 8). Les isolats à croissance vigoureuse telles que C1, C2 ou B1 ont un taux de sporulation inférieur à ceux possédant une croissance plus lente, telle que B2.

Tableau 24: Analyse de variance pour la sporulation des isolats de *Ascochyta rabiei* dans les régions, après 10 jours d'incubation à 20 ± 2 °C sur milieu CSMDA.

	SCE	DDL	CM	Valeur F
Régions	45,989	5	9,198	43,965**
Résiduelles	20,084	96	0,209	
Total	66,073	101		

** $P < 0,01$

Tableau 25: Classification des régions en groupes homogènes selon la valeur moyenne de sporulation des isolats.

Régions	N	Groupes homogènes ($P = 0.01$)			
		1	2	3	4
Relizane	18	2,0490 ^a			
Sidi Bel Abbes	12		1,6160 ^b		
Aïn Defla	18		1,3091 ^b		
Aïn Témouchent	18			0,9465 ^c	
Mostaganem	12				0,2793 ^d
Mascara	18				0,2566 ^d

N= Nombre d'échantillon

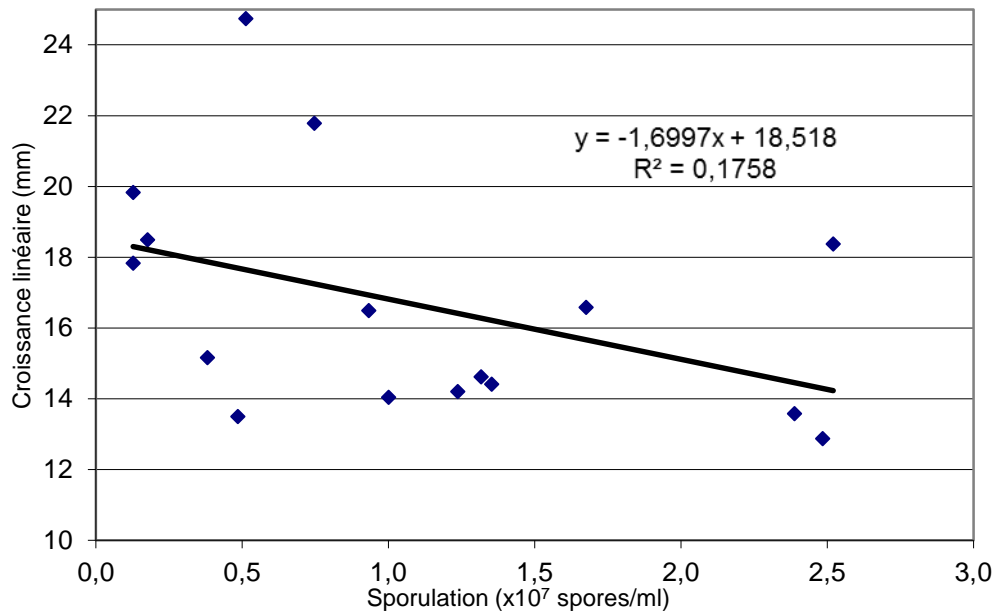


Figure 29: Corrélation entre la croissance et la sporulation des isolats de *A. rabiei*

1.2. Discussion

L'étude sur les aspects culturels montre une variabilité importante chez *Ascochyta rabiei*, souvent au sein même des isolats de la même région. Malgré le nombre restreint d'isolats testés, 5 groupes de pigmentation différents sont mis en évidence (gris-souris ; vert olive ; vert clair, Brun foncé et brun). Des études précédentes (Labdi, 1990 ; Gharbi et *al.*, 2015) sur des isolats de l'ouest algérien ont également montré des différences dans la pigmentation des colonies du parasite. Généralement la couleur du mycélium est variable sur milieu CSMDA.

Le diamètre des colonies varie selon l'isolat, ceci est en accord avec d'autres études qui ont démontré la variabilité de la croissance mycélienne de *A. rabiei* (Basandrai et *al.*, 2005; Ozkilinc et *al.*, 2010). Une variabilité similaire, dans les caractères morphologiques et culturels entre les isolats de *A. rabiei*, a été signalée dans divers pays (Grewal, 1984; kaiser, 1973). Cependant, ces variations ne sont pas corrélées avec l'origine géographique et la variation pathogénique dans plusieurs études antérieures (Pande et *al.*, 2005).

Les travaux de Gharbi et *al.* (2013) sur l'aspect morphologique et cultural de dix isolats de *A. rabiei* issus de cinq régions de l'ouest algérien n'ont pas également permis de différencier entre les isolats, cependant ses travaux ont mis en évidence des différences au niveau de leur activité pectinolytique.

Chez le couple *Septoria nodorum*/blé, Ayad et al. (2014) signalent que la variabilité morphologique est un des critères de la diversité génétique des populations.

La taille des conidies est aussi variable et comparable aux données obtenues avec des isolats australiens (Udupa et al., 1997) et indiens (Basandrai et al., 2005), mais elle est différente de celle étudiée en Espagne (Viotti et al., 2012).

Chez le genre *Ascochyta* les conidies sont décrites comme bicellulaires (Barnett et Hunter, 1998). En réalité, l'espèce *Ascochyta rabiei* n'en possède qu'une petite proportion, la plupart sont monocellulaires (Khan et al., 1999). Nos observations montrent des conidies monocellulaires, rarement bicellulaires (3 à 4%), hyalines, droites, cylindriques, arrondies à l'une ou aux deux extrémités comme décrits par de nombreux chercheurs (Punithalingham et Holliday, 1972 ; Nene, 1982). Ce qui confirme que nous sommes bien en présence de l'espèce *Ascochyta rabiei*.

Par ailleurs nous observons une corrélation inverse entre la croissance mycélienne et la sporulation. Les isolats ayant une forte croissance mycélienne sporulent peu. Nos résultats corroborent les travaux de Grewal (1984) qui note une corrélation similaire chez les isolats de diverses régions de l'Inde. Une telle corrélation négative renseigne sur le compromis existant entre la croissance mycélienne et la sporogénèse, lorsque les ressources sont limitées lors de la croissance mycélienne ou de la sporulation (Schmit, 2002).

Chapitre II

Diversité pathogénique des isolats de *Ascochyta rabiei*

2.1. Résultats

L'utilisation de cultivars résistants est la stratégie la plus efficace et économique pour lutter contre l'antracnose du pois chiche. Toutefois, la sélection de ceux résistants contre l'antracnose est difficile, en raison de la variabilité pathogénique de *A. rabiei*. Ainsi la détermination des pathotypes est essentielle pour la sélection des cultivars résistants.

La présence de téléomorphe dans le cycle de vie de *A. rabiei* contribue à la variabilité au sein de la population pathogène, ce qui peut générer une nouvelle combinaison de gènes de virulence et le développement de nouveaux pathotypes (Pande et *al.*, 2005).

Un certain nombre d'entre eux est signalé; par exemple, dix pathotypes par Vir et Grewal (1974), cinq par Nene et Reddy (1987) et onze par Jan et Wiese (1991) dans la région du Palouse en USA. Par la suite, trois pathotypes classés pathotype I (faiblement agressif), II (moyennement agressifs) et III (très agressif) sont identifiés par Udupa et Weigand (1997) en Syrie, puis par Udupa et *al.* (1998). Cette dernière classification est maintenant largement reconnue par de nombreux chercheurs. Toutes ces recherches ont été menées sur une gamme d'hôtes différente, utilisant des échelles de notation différentes, ce qui ne permet pas d'établir des comparaisons fiables.

Cette étude est menée alors pour déterminer les pathotypes existant et leur importance relative dans les cultures de pois chiche du nord-ouest algérien et aussi pour rechercher une corrélation avec les caractères morphologiques, et culturels, pathogéniques et moléculaires des isolats étudiés.

2.1.1. Variabilité du pouvoir pathogène des isolats de *Ascochyta rabiei*

Une caractérisation pathogénique des isolats de *Ascochyta rabiei* est réalisée sur onze lignées de pois chiche (Flip 9393 C, ILC 263, ILC 8068, ILC 7795, ILC 249, ILC 483, ILC 3996, ILC 484, ILC 1929, ILC 482 and ILC 3279).

Le choix est porté sur ces lignées car elles utilisées dans les tests de pathogénicité dans de nombreux travaux sur le pouvoir pathogène *A. rabiei*. L'inoculation artificielle de ces lignées avec chacun des isolats (16) a conduit à l'apparition de symptômes typiques de l'antracnose, à savoir des lésions sur les feuilles et les tiges (Fig. 30). La caractérisation du

pouvoir pathogène, évaluée 14 jours après l'inoculation, a révélé une variabilité pathogénique parmi les isolats testés.

Les indices de notations de la maladie obtenus à partir de plantes individuelles sont représentés dans le tableau 26.

Huit parmi les seize isolats peuvent être considérés comme agressifs avec des indices moyens de la maladie supérieurs à 5, trois sont très agressifs avec des valeurs moyennes supérieures à 6 (Tab. 26). Deux de ces isolats très agressifs, isolats C3 et M2 issus des champs de Mascara et Mostaganem, respectivement, ont provoqué sévères symptômes sur la lignée ILC 3279 pourtant connue résistante dans la plupart des régions du monde où elle est cultivée (Fig. 31). La plupart des lignées de pois chiches sont moyennement résistantes (Tab. 27), avec des valeurs moyennes comprises entre 4 et 5 (Tab. 26).



Figure 30 : Plantes de la lignée Flip 9393C montrant des symptômes sévères d'antracnose, 14 jours après inoculation par une suspension sporale (5×10^5 spores/ml) de l'isolat R3.



Figure 31: Plantes de la lignée ILC 3279 montrant des symptômes sévères d'antracnose, 14 jours après inoculation par une suspension sporale (5×10^5 spores/ml) de l'isolat M2.

Tableau 26: Notation de la maladie (1 à 9) causée par les isolats de *Ascochyta rabiei* sur 11 lignées de pois chiche.

Isolat	Lignées											Moy.
	Flip 9393c	ILC 263	ILC 8068	ILC 7795	ILC 249	ILC 483	ICC 3996	ILC 484	ILC 1929	ILC 482	ILC 3279	
M1	3,1±0,6	6±0,0	5,3±0,5	3,1±0,4	4±0,0	5±0,5	2,9±0,6	3,8±0,9	7±0,5	3±0,0	4±0,8	4,28^{hi}
M2	6,3±1,2	9±0,0	5,8±0,9	9±0,0	7,3±0,7	7,3±0,7	7,5±0,8	7±0,0	9±0,0	7±0,0	7±0,0	7,45^a
B1	5,3±0,5	7±0,5	5±0,0	7,8±0,5	5,3±0,7	5±0,0	4,6±0,5	5,3±0,5	5,9±0,4	6,9±0,6	3±0,5	5,53^{cd}
B2	2,8±0,5	7±0,0	4±0,0	6±0,0	3,8±0,5	4,1±0,4	3±0,5	3±0,0	5,4±0,7	4,8±0,5	4,9±0,6	4,42^{hi}
C1	5,6±0,7	5,4±0,9	4,6±0,7	6±1,5	5,6±0,7	3±0,0	4±0,5	5,3±0,7	9±0,0	7±0,5	4,6±0,7	5,47^{cd}
C2	5±1,1	8,1±0,6	5,5±0,8	5,4±0,7	5,8±0,5	5,3±0,9	3,6±0,7	4,8±0,9	8±0,5	7,1±0,6	3,6±0,9	5,65^c
C3	7±0,0	9±0,0	6,8±0,5	7,4±0,7	7,4±1,4	6,6±0,7	6±0,0	6,8±0,5	9±0,0	7,3±0,5	6,4±1,2	7,23^a
Z1	3±0,5	6,3±0,5	4,1±0,6	5,8±0,5	4,1±0,4	4,8±0,9	4,4±0,7	4±0,0	6±0,0	3,9±1,1	3,1±1,0	4,49^{ghi}
Z2	2,5±0,5	7,5±1,1	3,5±0,8	6±0,0	3±0,5	4±0,0	3,9±0,4	5,5±0,5	5,9±0,4	4,9±0,8	3,8±0,8	4,58^{gh}
Z3	5,1±0,4	6,3±0,5	4,3±0,5	5±0,8	2,3±0,5	5,1±0,3	3,1±0,4	2,8±0,5	5,9±0,6	3±0,0	4,6±0,7	4,31^{hi}
A1	3±0,0	6,1±0,4	4,1±0,4	5,3±0,7	4±0,5	3,3±0,5	5±0,5	3,8±0,5	5,4±0,5	4±0,0	3±0,0	4,26ⁱ
A2	4,6±0,7	7±0,0	5±0,5	4,5±0,8	6±0,8	4,6±0,7	4±0,5	3,8±0,4	7,1±0,4	4,8±0,6	4±0,5	5,03^e
A3	6±0,5	6±0,5	3±0,0	4±0,5	3,1±0,6	6±0,0	4±0,0	5±0,0	5,6±0,6	5,6±0,7	4,6±0,5	4,82^{ef}
R1	5,3±0,7	9±0,0	2±0,5	5,3±0,9	4,1±0,6	4±0,5	3,6±0,7	3,8±0,5	8±0,0	3,8±0,9	3,1±0,8	4,72^{fg}
R2	4,4±1,1	9±0,0	5±1,1	5±0,8	5,6±0,5	3±0,0	3,9±0,6	5,5±0,8	8,1±1,2	5,4±1,0	3,6±0,9	5,32^d
R3	7,1±0,6	6,1±1,2	6,3±0,5	4±0,5	6,5±0,9	6,8±0,7	6,4±1	7±0,5	8,4±0,9	6±0,0	4,8±0,9	6,30^b
Moyenn	4,75^d	7,17^a	4,63^d	5,59^b	4,86^d	4,86^d	4,37^e	4,8^d	7,1^a	5,27^c	4,26^e	

^{A,b,...,n} lettres de ^a à ⁿ indiquent la comparaison de moyennes pour le même effet lignées et isolats. Les lignées et les isolats portant la même lettre sont dans le même groupe homogène.

Tableau 27: Réaction des lignées de pois chiche 14 jours après inoculation par *A. rabiei*

Isolats	ILC 9393c	ILC 263	ILC 8068	ILC 7795	ILC 249	ILC 483	ICC 3996	ILC 484	ILC 1929	ILC 482	ILC 3279
M1	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R	R
M2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
B2	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R
C1	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	R
C2	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R
C3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Z1	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R
Z2	R	S	R	S	R	R	R	S	S	R	R
Z3	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	R
A1	R	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R
A2	R	S	S	R	S	R	R	R	S	R	R
A3	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R
R1	S	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R
R2	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
R3	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R

R = Résistant, S = Sensible

L'analyse de la variance montre que les effets du génotype et de l'isolat ainsi que leur interaction sont très significatifs pour ces deux paramètres (Tab. 28). Le test de Newman-Keuls aux 5 % et 1 % permet d'établir des groupes homogènes (Tab. 26, annexe 9).

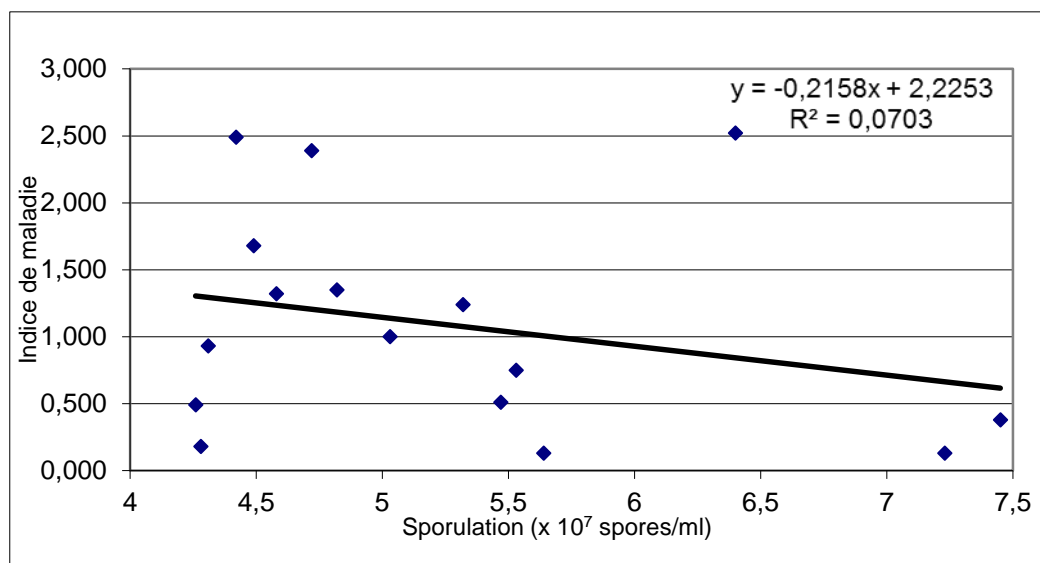
Une corrélation inverse entre l'agressivité et la sporulation est observée pour l'ensemble des isolats avec une valeur de R de -0,27 à $p = 0,05$ (Fig. 32, annexe 8). Les isolats les plus agressifs tels que C3 et M2 possèdent une sporulation faible. Il y'a lieu de remarquer que les isolats C3 et M2 sont les plus agressifs tout étant moins sporulants.

Tableau 28: Analyse de variance du pouvoir pathogène des isolats de *A. rabiei* après inoculation de onze lignées de pois chiche (14 jours après l'inoculation).

Source de variation	SCE	^a DDL	^b CM	Valeur de F
Isolat	1336,46	15	89,09	252,55**
Genotype	1297,825	10	129,78	367,88**
Isolat x Genotype	1132,469	150	7,55	21,40**
Erreur	434,625	1232	0,35	

^addl: degrés de liberté^bCM: carré moyen

**hautement significatif à 0,01

**Figure 32:** Corrélation entre l'agressivité et la sporulation des isolats de *A. rabiei*

2.1.2. Identification des pathotypes

Avec trois génotypes de pois chiche différentiels (ILC 1929, ILC 482, ILC 3279). Grâce à la même gamme d'hôtes différentiels nous avons réalisé un travail d'identification de pathotypes existant dans le nord-ouest algérien.

Comme indiqué dans le tableau 30, les isolats sont classés en 3 pathotypes : neuf isolats appartiennent au pathotype I, cinq au pathotype II, et deux au Pathotype III. Les isolats M2 et C3 (pathotype III) qui ont réussi à surmonter la résistance de l'ILC 3279 (Fig. 33) sont les plus agressifs selon leurs valeurs moyennes.

Nos résultats montrent ainsi que le pathotype le plus prédominant dans le nord-ouest algérien est le pathotype I qui est présent dans les cinq régions sur les six étudiées. Le pathotype II (moyennement agressif) présent dans quatre régions et le pathotype III

(hautement agressif) dans la région de Mostaganem et celle de Mascara. L'analyse de variance au seuil de 1% montre des résultats hautement significatifs (Tab. 29). Le test de Newman-Keuls a permis le classement des lignées dans trois groupes homogènes (Tab. 30 ; annexe 10) et les isolats en cinq groupes.



Figure 33: Sévérité des symptômes sur les plantes de ILC 3279 suite à leur inoculation par une suspension sporale (5×10^5 spores/ml) de l'isolat M2.

Tableau 29: Analyse de variance du pouvoir pathogène des isolats de *A. rabiei* après inoculation de trois lignées différentielles (14 jours après l'inoculation).

Source de variation	^a DDL	^b CM	F
Isolat	15	23,17	34,46**
Genotype	2	562,79	837,21**
Isolat x Genotype	30	8,18	12,17**
Erreur	240	0,67	

** significatif à 0,01

Tableau 30 : Pathotypes de *Ascochyta rabiei* caractérisés par l'inoculation de trois lignées de pois chiche différentielles.

Isolat	Lignée ILC 1929	Lignée ILC 482	Lignée ILC 3279	Moyenne	Pathotype
M1	7,3±0,82	2,7±0,82	3,3±0,82	4,4 ^{de}	I
M2	9±0,00	7±0,00	6,7±0,82	7,6 ^a	III
B1	7,3±0,82	7,3±0,82	2,3±1,03	5,7 ^{bc}	II
B2	7±0,00	3±0,00	2,7±0,82	4,2 ^{de}	I
C1	9±0,00	6,7±0,82	3,3±0,82	6,3 ^b	II
C2	8±1,67	6,7±0,82	3±0	5,9 ^{bc}	II
C3	9±0,00	7,3±0,82	7±0,00	7,8 ^a	III
Z1	8,7±0,82	3±1,12	1,3±0,82	4,3 ^{de}	I
Z2	7±0,00	4,7±0,82	3,7±1,03	5,1 ^{cd}	I
Z3	8±1,67	2,3±1,03	1,3±0,82	3,9 ^e	I
A1	6,7±0,82	3,3±0,82	3±0,82	4,3 ^{de}	I
A2	8,7±0,82	5±0,00	3,3±0,82	5,6 ^{bc}	I
A3	7,3±1,51	7±0,00	4±1,10	6,1 ^b	II
R1	9±0,00	3,3±0,82	3±0,00	5,1 ^{cd}	I
R2	9±0,00	5±0,00	2,7±0,82	5,6 ^{bc}	I
R3	9±0,00	6±1,67	3±0,00	6,0 ^{bc}	II
Moyenne	8,1 ^a	4,9 ^b	3,3 ^c		

2.2. Discussion

L'interaction entre des génotypes de pois chiche avec une gamme d'isolats de *A. rabiei*, issus du nord-ouest algérien, a permis de noter de grandes variations dans la réaction des lignées. Aucune d'entre elles n'est résistante à tous les isolats.

La mise en évidence d'interactions différentielles, entre les isolats de *A. rabiei* et les génotypes de pois chiche, doit être considérée comme un indice d'une spécialisation spécifique dans la virulence de *A. rabiei* et la résistance du pois chiche. Van Der Plank (1968) donne des exemples de races à interaction différentielle sur les variétés de pomme de terre inoculées par *Phytophthora infestans*, ou pour l'interaction entre des isolats de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et deux variétés de tomate. Par ailleurs, plusieurs travaux antérieurs ont rapporté la présence d'interaction isolat- génotype dans le système pois chiche - *A. rabiei* (Chettou et al., 2005 ; Bouznad, 1991; Reddy et Kabbabeh, 1985; Aujla, 1964).

A ce jour, les sources de résistance existantes présentent plutôt des niveaux de type verticale (monogénique) (Singh et Reddy, 1993). Une telle résistance est souvent contrôlée par un seul gène dominant ou récessif (Singh et al., 1989 ; Halila et al., 1989). Cette situation est décrite auparavant par la théorie de Flor (1956) pour d'autres pathosystèmes, qui stipule que pour un gène de résistance verticale de l'hôte, il existe un gène de virulence chez le parasite capable de le vaincre. L'isolat du parasite qui porte ce gène est dénommé race physiologique ou pathotype (Rapilly, 1991).

La sensibilité de la lignée ICC 3996 à C3 et M2 indique que ces deux isolats pourraient appartenir au pathotype IV comme décrit pour *A. rabiei* en Syrie par Atik et al. (2013).

Notre étude montre aussi qu'il n'y a pas de corrélation entre les caractères morphologiques et culturels (taille des spores, croissance mycélienne, sporulation) et la pathogénicité des isolats ou le pathotype auquel ceux-ci appartiennent. Nos résultats confirment ceux de Thrall et al. (2005) et Pariaud et al. (2009) qui montrent que la croissance *in vitro* d'un champignon n'est pas toujours en corrélation avec son agressivité. Par contre Ozkilinc et al. (2011) a noté que la forte croissance mycélienne d'isolats israéliens de *A. rabiei in vitro* est associée à leur forte agressivité *in vivo*.

Tous les pathotypes cités par Udupa et Weigand (1997) sont actuellement présents dans le nord-ouest algérien. En outre, la sensibilité des génotypes locaux est établie; des

cultivars connus jusque-là comme résistants lors de leur introduction en Algérie, s'avèrent maintenant sensibles, exemple de ILC 3279 vis-à-vis de l'isolat C3 et M2 (pathotype III). Il est même possible que l'isolat M2 appartienne au pathotype IV, déjà signalé en Syrie où il semble être capable d'affecter les génotypes les plus résistants comme ICC-3996 et ICC-12004 (Imtiaz et al., 2011). Nos résultats montrent ainsi que le pathotype le plus prédominant dans le nord-ouest algérien est la pathotype I qui est également prédominant avec le pathotype III en Turquie (Türkkan et Dolar, 2009).

NB/ Les chapitres I et II précédents ont fait l'objet d'une publication (voir page suivante) dans :

American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 15 (6): 1136-1146, 2015

ISSN 1818-6769

© IDOSI Publications, 2015

DOI: 10.5829/idosi.aejaes.2015.15.6.94125

Titre de la publication :

Physiological Characterisation of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. Isolated from Diseased Chickpea Fields in Six Regions of Northwestern Algeria.

Auteurs:

Djamel Mahiout ¹, Boubekeur Seddik Bendahmane ¹, Mokhtar Youcef Benkada ¹ and ² Martina Rickauer.

¹Laboratoire de Protection des Végétaux, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid Ibn Badis De Mostaganem, BP 188, 27000 Algeria.

²Université De Toulouse, INP-ENSAT, UMR5245 Ecolab, 18 Chemin de Borde Rouge, Pôle De Biotechnologie Végétale, 31326 Castanet-Tolosan, France.

PUBLICATION

Physiological Characterisation of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. Isolated from Diseased Chickpea Fields in Six Regions of Northwestern Algeria

¹Djamel Mahiout, ¹Boubekeur Seddik Bendahmane, ¹Mokhtar Youcef Benkada and ²Martina Rickauer

¹Laboratoire de Protection des Végétaux, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid Ibn Badis De Mostaganem, BP 188, 27000 Algeria

²Université De Toulouse, INP-ENSAT, UMR5245 Ecolab, 18 Chemin de Borde Rouge, Pôle De Biotechnologie Végétale, 31326 Castanet-Tolosan, France

Abstract: The ascochyta blight fungus *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. is considered the most damaging pathogen of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Sixteen isolates of the pathogen were collected from six regions in north-western Algeria and were studied for cultural diversity, morphology, pathogenicity and mating type. These isolates showed variation in colony colour as mouse gray, light green, olive green, brown and dark brown, when grown on chickpea seed meal dextrose agar. The produced Conidia had a length ranging from 5.2 to 17.2 μm and a width between 2.4 and 6.7 μm . Their number varied from $0.13 \times 10^7/\text{ml}$ to $2.52 \times 10^7/\text{ml}$. The aggressiveness of isolates was evaluated on 11 chickpea lines. Disease rating on a 1-9 scale indicated a large variability among them and revealed occurrence of the highly aggressive pathotype III in two regions. Both mating types 1-1 and 1-2 were detected. Results from this study show that local strains may overcome resistance in commonly used chickpea cultivars. Some of the described isolates will be useful for breeding *Ascochyta* blight-resistant chickpea cultivars adapted to geographical regions and for developing necessary control measures.

Key words: *Ascochyta Rabiei* • *Cicer arietinum* L. • Disease Resistance • Pathotype • Plant Breeding • Mating Type

INTRODUCTION

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is the third most important food legume in the world after dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and field pea (*Pisum sativum* L.). It is a major source of high-quality protein in human diets and also provides high quality crop residues for animal feed. Legume plants such as chickpea maintain soil fertility through biological nitrogen fixation.

Unfortunately, several factors are responsible of low crop yields in the world. Drought, salinity and cold [2,3,4,5] are a serious problem. The crop also is subject to infection by several fungal affecting all the plant parts (seed, leaves, crown and roots).

Foliar diseases that affecting leaves and stems of the plants constitute one of the most serious groups causing great damage to the crop.

One of the main diseases which reduce potential yield in chickpea is ascochyta blight caused by *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. [6]. Frequently, it devastates chickpea crop areas and causes heavy losses (up to 100 %) in severely affected fields [7].

Ascochyta rabiei has been reported in 29 countries world-wide [8]. Symptoms of the disease include wilting leaf tips, leaf lesions, stem lesions causing stem breakage and lesions on pods resulting in seed infection. The two most damaging symptoms are stem breakage and pod infection .

The occurrence of differences in cultural characteristics and pathogenicity among isolates of this pathogen is well known. The genetic variability in *A. rabiei* is enhanced by the presence of its teleomorph (*Didymella rabiei* (Kav.) under field conditions [9]. Pathogenic variability among isolates of *A. rabiei* has

been reported from India [9], Syria and Lebanon [10,11], USA [12], Italy [13], Pakistan [9,14], Spain [9], Australia [15], Tunisia [16] and in Canada [17]. These studies have used between 3 and 15 differential host genotypes and classified between 11 and 130 isolates of *A. rabiei* into 3 to 14 pathotypes. Pathotypes can be characterised by differences in the amount of disease (differential virulence) caused on a set of differential host genotypes in artificial inoculation experiments employing single-spore isolates of the pathogen.

Udapa *et al.* [18] suggested that as few as three differentials from each class (susceptible, moderately resistant and highly resistant) of the host plant are sufficient for classifying *A. rabiei* isolates into 3 pathotypes based on increasing level of aggressiveness. The standard set of chickpea differentials used at ICARDA consists of 'ILC 3279' as a resistant genotype, 'ILC 482' as tolerant and 'ILC 1929' as a susceptible genotype [14]. Similarly, the United States Department of Agriculture (USDA) uses cultivars 'Dwellely' and 'Spanish White' for pathotyping isolates into Pathotype I (low pathogenicity) and Pathotype II (high pathogenicity) respectively [19].

Development of resistant or tolerant chickpea cultivars is the most practical way to control Ascochyta blight [20]. However, cultivating resistant cultivars will eventually result in the selection of new pathotypes or races able to overcome the resistance gene(s) introduced by breeding [21]. Hence the design of proper breeding strategies requires biological and genetic characterisation of the pathogen and the comprehension of disease mechanisms.

The aim of the present study was to characterise *A. rabiei* isolates obtained from different chickpea growing areas of North-western Algeria using cultural and pathological characteristics as well a molecular marker for mating type.

MATERIALS AND METHODS

Sampling, Isolation and Maintenance of Fungal Isolates: During chickpea growing season of 2009, chickpea plants with brown or black lesions on stem, leaves and pods were collected from farmer's fields in various areas of North western Algeria (Figure 1; Table 1).

Sampling sites were at least 100 km away from each other and belong to regions with different altitudes and climate. Regions near the sea (Mostaganem, Ain Temouchent) have a temperate climate with high air humidity during the whole year, whereas regions in the

Table 1: Geographical origin and designation of *Ascochyta rabiei* isolates from North-western Algeria

Province (Wilaya)	Site	Designation of isolate
Mascara	Rachidia	C1
	El- Houaire	C2
	Ain Fares	C3
Ain Témouchent	Ain Témouchent	A1
	Hammam Bouhadjar	A2
	Ain Tolba	A3
Sidi Belabbes	Attouche	B1
	Tessala	B2
Mostaganem	Hessainia	M1, M2
Relizane	Relizane	R1, R2, R3
Ain Defla	Oued Zeboudj	Z1, Z2, Z3

interior plains (Relisane, Mascara, Sidi Belabbes) have harsher winters and a dry summer season between May and October and the interior mountains of region Ain Defla region have the highest rainfall and even snow in winter.

Diseased samples were surfaces sterilized in 0.1% mercuric chloride for 1 minute and plated on chickpea seed dextrose agar (CSMDA; 40 g chickpea seed meal; 20 g dextrose; 20 g agar per liter of water)[22]. Each isolate was purified by single spore culture [23] and incubated at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for 2 weeks. The pycnidiospores were stored in 25% sterile glycerol at -80°C until use.

Sixteen isolates were obtained from chickpea presenting typical ascochyta blight symptoms, from fields in 6 regions of north western Algeria with different agro climatic conditions. They were maintained as monosporic cultures and characterised.

Koch's postulate was checked to assess the responsibility of each isolate in the disease. Each isolate was inoculated (10^6 conidia/ml) on two plants of chickpea line ILC 263 (susceptible). All plants showed typical symptoms of *A. rabiei* ten days after inoculation and the fungus could be re-isolated from diseased plants.

***A. rabiei* Cultural and Morphological Parameter Assessment:** Discs of 5 mm diameter from actively growing cultures of *A. rabiei* were placed in the center of 90 mm diameter Petri dishes containing CSMDA. Inoculated plates were incubated at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ and observed for colour and diameter (mm) of colony, amount and size of conidia.

For quantification of conidia, the Petri dish was flooded with 10 ml of sterile distilled water. After 20 minutes of incubation, the colony was gently scraped with a glass rod to release pycnidiospores. The spore suspension containing spores was collected in a beaker and spore concentration was determined with a Malassez haematocytometer. The experiments were conducted with six replicates.

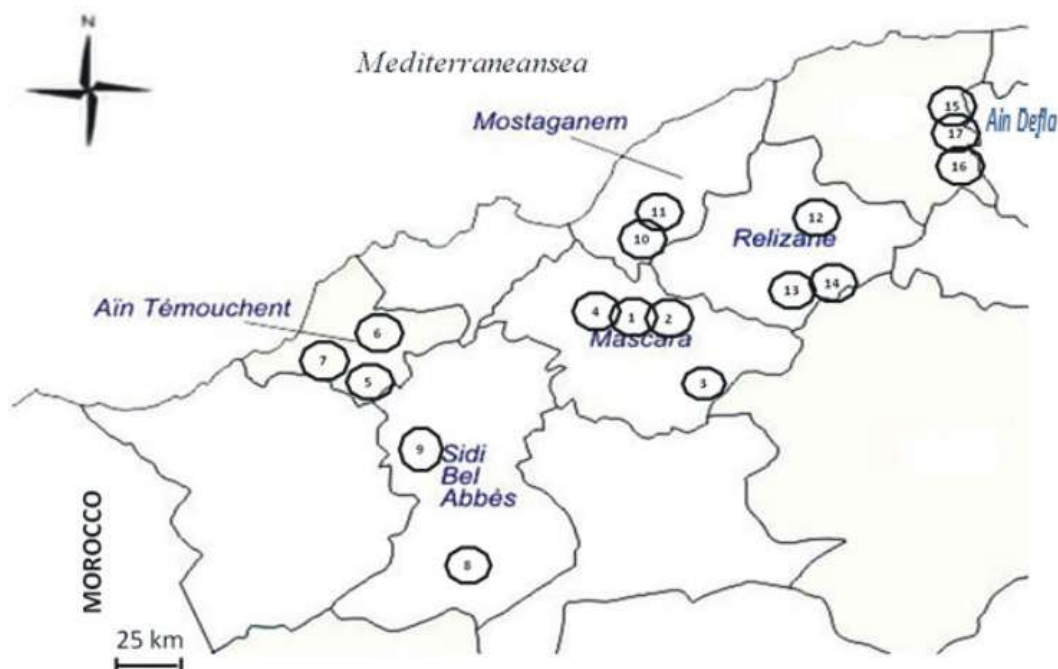


Fig. 1: Collecting sites of *Ascochyta rabiei* in regions of north-western Algeria

The isolates were collected from fields in the following villages: 1-Rachidia, 2-El Houaire, 3-Ain fares, 4- Zakor 5- Ain Temouchent, 6- Hammam Bouhdjar, 7- Ain Tolba, 8-Attouche, 9- Tessala, 10-Hessainia, 11-Hessainia, 12-Relizane, 13-Relizane, 14- Relizane, 15-Oued Zeboudj, 16- OuedZeboudj, 17-Oued Zeboudj.

Plant Culture: Eleven chickpea genotypes (Flip 9393 C, ILC 263, ILC 8068, ILC 7795, ILC 249, ILC 483, ILC 3996, ILC 484, ILC 1929, ILC 482 and ILC 3279) were obtained from Algiers's ITGC (Institut Technique des Grandes Cultures). This collection belongs to ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry areas, Syria) and ICRISAT (International Crops Research Institute for the semi-arid, India). The seeds were surface sterilized with 1% sodium hypochlorite for 3 min and washed 3 times with sterile distilled water [24], then sown (1 seed per pot) in 14 cm pots containing sterilized mixtures of soil and sand (1:1, v/v). Plants were grown in the green house at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for 14 days.

Plant Inoculation: A spore suspension of each isolate was prepared from 15-day-old cultures as described above. The suspension was filtered through two layers of muslin cloth and spore concentration was determined with a haemocytometer and adjusted to 5×10^5 spores per ml with sterile distilled water. Tween 20 (0.05%) was added to the spore suspension as a surfactant agent for sticking the spore to leaves of chickpea plants. The plants were inoculated by spraying the spore suspension until run-off and kept under a humid chamber for 48 hours in a

glasshouse [25]. Relative humidity was maintained at 95-100 %. Each treatment consisted of three replicates and each replication consisted of 4 plants.

Disease Symptom Scoring: The disease reactions of individual plants were scored 14 days after inoculation on a scoring scale from 1 to 9 [26] as follows:

- 1 = no infection;
- 2 = highly resistant (lesions on 1–5% of the plant);
- 3 = resistant (lesions on 6–10%);
- 4 = moderately resistant (lesions on 11–15%);
- 5 = intermediate (lesions on 16–40%);
- 6 = moderately susceptible (lesions on 41–50%);
- 7 = susceptible (lesions on 51–75%);
- 8 = highly susceptible (lesions on 76–100%);
- 9 = highly susceptible, plant killed.

According to Reddy & Singh [26], resistance for an individual plant was defined as a disease score less than or equal to five. Accessions possessing mean disease scores of less than five were described as resistant.

Mean disease scores were subjected to analysis of variance (ANOVA) in order to detect differences between different accessions.

For Determination of *A. rabiei* pathotypes, a set of three chickpea cultivars (ILC 1929, ILC 482, ILC 3279) was used [11]. Two independent experiments were conducted. Each experiment consisted of three replications with 20 plants in each replication. The conditions of inoculation and culture of plants are the same as described above. Fourteen days after inoculation, cultivars were assessed using the 1-9 scale described by Singh et al. [25] as follows:

- 1= no visible lesions on any plants (highly resistant);
 - 3= lesions visible on less than 10% of the plants, no stem girdling (resistant);
 - 5= lesions visible on up to 25% of the plants, stem girdling on less than 10% of the plants but little damage (tolerant);
 - 7= lesions on most plants, stem girdling on less than 50 % of the plants resulting in the death of a few plants (susceptible);
 - 9= lesions profuse on all plants, stem girdling on more than 50 % of the plants and death of most plants (highly susceptible).
- Cultivars rated less than 5.0 were considered resistant.

Molecular Characterization of *A. rabiei* Isolates: Discs from the growing margin of single spore colonies on CSMDA were used to inoculate 200 ml potato dextrose broth (PDB, Difco) in 250 ml flasks. After incubation at 20°C for 7 days, mycelia mats were harvested by filtering through Whatman paper n°1. Genomic DNA was extracted with 2% hexadecyltrimethyl-ammonium bromide (CTAB) extraction buffer (1.4 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl pH: 8.0, 20 mM EDTA, 0.2% β-mercaptoethanol) using the method of Weising *et al.* [27]. DNA concentration was measured in a spectrophotometer at 260 nm.

PCR amplifications were carried out in a 25 µl reaction volume containing 20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs and 1 unit *Taq* DNA polymerase. Fungal DNA concentration was 2 µg/ml for ITS regions and 4 µg/ml for mating type locus. Primer concentrations were 0.2 µM for ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) [28] and 0,4 µM for mating type primers Tail5 (CGCTATTTTATCCAAGACACACC), Com 1 (GCATGCCATATCGCCAGT) and SP21 (ACAGTGAGCCTGCACAGTTC) as described by Barve *et al.* [29]. Amplifications were performed in a thermal cycler with an initial denaturation step for 1 min at 94°C, followed by 38 cycles for ITS primers and 45 cycles for mating type primers of 30 sec at 94°C, 1 min at annealing

temperature, 1 min at 72°C, with a final extension for 2.5 min at 72°C. The annealing temperature was 50°C for ITS and 58°C for mating type primers. *A. rabiei* DNA from isolates of known mating types was obtained from Dr. Sabine Banniza/ (University of Saskatchewan, Canada) and used as a control.

The PCR products were separated electrophoretically in a 1.4% agarose gel in 40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA pH 8.0 (TAE) buffer [30]. The gels were stained with ethidium bromide (0.1 µg/ml) and visualized under UV light. Size markers were 1 kb ladder and 100bp ladder from Invitrogen (France).

PCR products of the ITS regions were sequenced with universal ITS1 and ITS4 primers by Beckman Coulter Genomics (England).

RESULTS

Sixteen isolates were obtained from chickpea presenting typical ascochyta blight symptoms, from fields in 6 regions of north western Algeria with different agroclimatic conditions. They were maintained as monosporic cultures and characterised.

Koch's postulate was checked to confirm the responsibility of each isolate in the disease. Each isolate was inoculated (10⁶ conidia/ml) on two chickpea plants belonging to line ILC 263 (susceptible). All plants showed typical symptoms of *A. rabiei* ten days after inoculation. Re-isolation of the fungus from diseased plants confirmed that all isolates were the causal agent of ascochyta blight and Blastn analysis of the sequenced fungal ITS rDNA region showed that all the sixteen isolates belonged to *A. rabiei*.

Cultural and Morphological Variation of *A. rabiei*: The 16 *A. rabiei* isolates were first characterised by the observation of morphological and cultural traits. As shown in Table 2, clear differences were seen between isolates, notably with the three criteria coloration of colony, size of conidia and mycelial growth.

Mycelium of most isolates was olive green or mouse gray and varied in its intensity at the margins of the colonies. Some colonies of *A. rabiei* isolates had various shades of gray and white with distinct coloration in the center and the colony of isolate R2 was brown with a dark brown center (Table 2). Cirrhe colour was dirty white in isolates C2 and M1, brown in isolates M2, B1, B2, A2, A3, C1 and C3 and light brown for others isolates.

The colony diameter of the 16 isolates on CSMDA after 10 days of culture varied from 30.75mm for B2 to 54.5 for C1 being the maximum (Table 2).

Table 2: Morphological and cultural characteristics of *Ascochyta rabiei* isolates from North-western Algeria Growth and morphology parameters were recorded after 10 days of growth on CSMDA medium at 22 ±2 °C and values are means of six replications ±SE

Isolate	Colony colour	Cirrhe colour	Colony diameter (mm)	Conidia size (µm)	
				Width	Length
C1	Mouse gray	Brown	54,5 ±0,77	4,72 (3,12-5,7)	10,51 (5,98-14,2)
C2	Olive green	Dirty white	44,66 ±0,52	4,91 (3,4-5,6)	11,17 (6,2-13,8)
C3	Olive gray	Brown	40,67±1,08	5,54 (2,6-6,7)	12,14 (7,8-15,6)
A1	Olive green	Salmon	32±0,63	5,24 (2,4-6,4)	10,87 (6,8-15,6)
A2	Light green	Brown	33,08±0,20	4,97 (3,3-6)	10,73 (6,2-15)
A3	Mouse gray	Brown	33,82±1,44	4,36 (2,6- 6,5)	10,47 (7,54-13,78)
B1	Olive green	Brown	48,58±1,36	4,15 (2,8-6)	10,39 (6,2-16)
B2	Olive green	Brown	30,75±0,42	4,59 (3-6,4)	9,59 (6,4-14)
M1	Olive green	Dirty White	42±1,22	4,02 (2,85-5,72)	10,17 (5,98-13,2)
M2	Mouse gray	Brown	35,34±0,41	3,98 (2,86-5,98)	10,11 (5,98-16,12)
R1	Mouse gray	Light brown	32,17±0,26	4,45 (3,12-5,98)	10,14 (6-14,3)
R2	Dark brown	Light brown	33,42±0,49	4,64 (3,6-5,8)	10,99 (6-17,2)
R3	Dark brown	Light brown	41,74±0,52	4,54 (3,6-6)	10,31 (6,2-14,2)
Z1	Brown	Light brown	38,17±0,52	4,49 (3-5,98)	11,53 (6,24-13,6)
Z2	Mouse gray	Light brown	34,26±0,76	4,45 (3,12-5,72)	11,35 (5,2-15,08)
Z3	Olive green	Light brown	38±0,32	4,67 (3,64-5,8)	11,16 (6-15,5)

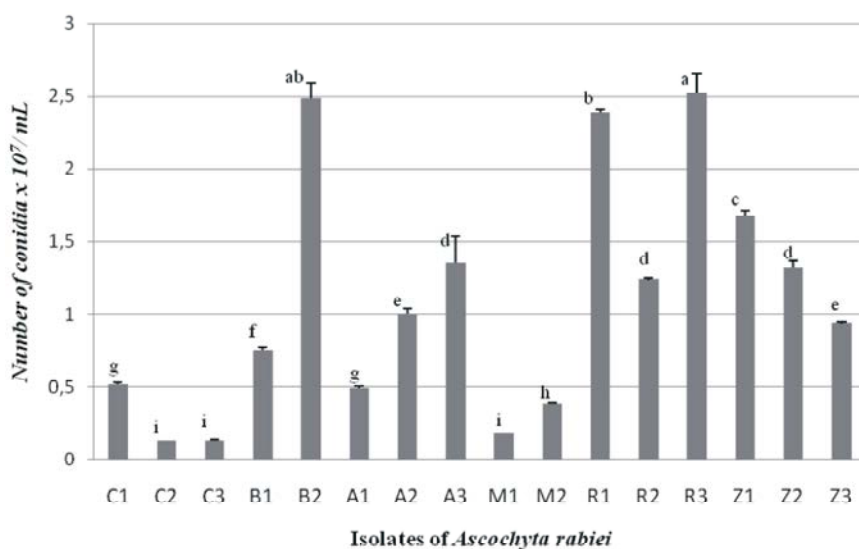


Fig. 2: Sporulation of *Ascochyta rabiei* isolates

Spore production was assessed after 10 days of culture on CSMDA medium. The values are means of six replications + SE

Conidial size also shows variation in length and width between the studied isolates. Conidia had a length ranging from 5.2 to 17.2 µm and a width ranging from 2.4 to 6.7 µm.

Values for sporulation of the 16 isolates are shown in Figure 2. The number of conidia varied from 0.13 x 10⁷/ml for C2 and C3 to 2.52 x 10⁷/ml for isolate R3. Sporulation varies greatly between the 16 isolates and the effect of strain is highly significant (Table 3). When mean values for sporulation were calculated for isolates from the same region, it seems that there is also an effect

of the region of origin. Isolates from Mascara (C1, C2, C3) and Mostaganem (M1, M2), produced low amounts of spores with mean values of 0.242 x 10⁷ sp/ml and 0.279 x 10⁷ sp/ml respectively, whereas those from Ain Temouchet (A1, A2, A3), Ain Defla (Z1, Z2, Z3), Sidi Belabbes (B1, B2) and Relizane (R1, R2, R3) produced consistently higher amounts with mean values of 0.947 x 10⁷ sp/ml, 1.309 x 10⁷ sp/ml, 1.616 x 10⁷ sp/ml and 2.049 x 10⁷ sp/ml respectively. The effect of region is highly significant at p<0,001 and allowed classification into 4 groups (Table 4).

Table 3: Analysis of variance for sporulation of *Ascochyta rabiei* isolates after 10 days of incubation at 20 ±2 °C on CSMDA medium.

Total variation	^a df	^b MS	F value
Isolate	15	4,08	912,12*
Error	80	0,004	

^adf: degree of freedom

^bMS: mean square

*significant at 0,05

Table 4: Classification of the regions into homogeneous groups according to the mean value of sporulation of the isolates

Region	N	Homogenous groups (P = 0.01)			
		1	2	3	4
Relizane	18	2,0490 ^a			
Sidi Belabbes	12		1,6160 ^b		
Ain Defla	18		1,3091 ^b		
Ain Témouchent	18			0,9465 ^c	
Mostaganem	12				0,2793 ^d
Mascara	18				0,2566 ^d

N=number of samples

Table 5: Disease scoring (1 to 9) of *Ascochyta rabiei* isolates on 11 differential chickpea genotypes and their mating type. Values represent means obtained in 2 replicates, with 4 plants in each replicate, + SE. Mating type was determined by PCR with specific MAT 1-1 or 1-2 primers

Isolate	Lines											Mean	Mating type (1 or 2)
	ILC 9393c	ILC 263	ILC 8068	ILC 7795	ILC 249	ILC 483	ICC 3996	ILC 484	ILC 1929	ILC 482	ILC 3279		
M1	3,1±0,6	6±0,0	5,3±0,5	3,1±0,4	4±0,0	5±0,5	2,9±0,6	3,8±0,9	7±0,5	3±0,0	4±0,8	4,28 ^{hi}	1
M2	6,3±1,2	9±0,0	5,8±0,9	9±0,0	7,3±0,7	7,3±0,7	7,5±0,8	7±0,0	9±0,0	7±0,0	7±0,0	7,45 ^a	1
B1	5,3±0,5	7±0,5	5±0,0	7,8±0,5	5,3±0,7	5±0,0	4,6±0,5	5,3±0,5	5,9±0,4	6,9±0,6	3±0,5	5,53 ^{cd}	1
B2	2,8±0,5	7±0,0	4±0,0	6±0,0	3,8±0,5	4,1±0,4	3±0,5	3±0,0	5,4±0,7	4,8±0,5	4,9±0,6	4,42 ^{hi}	1
C1	5,6±0,7	5,4±0,9	4,6±0,7	6±1,5	5,6±0,7	3±0,0	4±0,5	5,3±0,7	9±0,0	7±0,5	4,6±0,7	5,47 ^{cd}	1
C2	5±1,1	8,1±0,6	5,5±0,8	5,4±0,7	5,8±0,5	5,3±0,9	3,6±0,7	4,8±0,9	8±0,5	7,1±0,6	3,6±0,9	5,65 ^c	2
C3	7±0,0	9±0,0	6,8±0,5	7,4±0,7	7,4±1,4	6,6±0,7	6±0,0	6,8±0,5	9±0,0	7,3±0,5	6,4±1,2	7,23 ^a	2
Z1	3±0,5	6,3±0,5	4,1±0,6	5,8±0,5	4,1±0,4	4,8±0,9	4,4±0,7	4±0,0	6±0,0	3,9±1,1	3,1±1,0	4,49 ^{ehi}	1
Z2	2,5±0,5	7,5±1,1	3,5±0,8	6±0,0	3±0,5	4±0,0	3,9±0,4	5,5±0,5	5,9±0,4	4,9±0,8	3,8±0,8	4,58 ^{feh}	2
Z3	5,1±0,4	6,3±0,5	4,3±0,5	5±0,8	2,3±0,5	5,1±0,3	3,1±0,4	2,8±0,5	5,9±0,6	3±0,0	4,6±0,7	4,31 ^{hi}	2
A1	3±0,0	6,1±0,4	4,1±0,4	5,3±0,7	4±0,5	3,3±0,5	5±0,5	3,8±0,5	5,4±0,5	4±0,0	3±0,0	4,26 ⁱ	2
A2	4,6±0,7	7±0,0	5±0,5	4,5±0,8	6±0,8	4,6±0,7	4±0,5	3,8±0,4	7,1±0,4	4,8±0,6	4±0,5	5,03 ^e	1
A3	6±0,5	6±0,5	3±0,0	4±0,5	3,1±0,6	6±0,0	4±0,0	5±0,0	5,6±0,6	5,6±0,7	4,6±0,5	4,82 ^{ef}	2
R1	5,3±0,7	9±0,0	2±0,5	5,3±0,9	4,1±0,6	4±0,5	3,6±0,7	3,8±0,5	8±0,0	3,8±0,9	3,1±0,8	4,72 ^{ie}	1
R2	4,4±1,1	9±0,0	5±1,1	5±0,8	5,6±0,5	3±0,0	3,9±0,6	5,5±0,8	8,1±1,2	5,4±1,0	3,6±0,9	5,32 ^d	1
R3	7,1±0,6	6,1±1,2	6,3±0,5	4±0,5	6,5±0,9	6,8±0,7	6,4±1	7±0,5	8,4±0,9	6±0,0	4,8±0,9	6,30 ^b	1
Mean	4,75 ^d	7,17 ^a	4,63 ^d	5,59 ^b	4,86 ^d	4,86 ^d	4,37 ^e	4,8 ^d	7,1 ^a	5,27 ^c	4,26 ^e		

^{A,b,...,n} letters from ^a to ⁿ indicate comparison of mean for the main effect of lines and isolates. Lines or isolates with the same letter are in the same group.

Table 6: Analysis of variance for symptom scores in chickpea genotypes after 14 days of inoculation by *Ascochyta rabiei* isolates

Source of variation	^a df	^b MS	F value
Isolate	15	89,09	252,55**
Genotype	10	129,78	367,88**
Isolate x Genotype	150	7,55	21,40**
Error	1232	0,35	

^adf: degree of freedom

^bMS: mean square

**significant at 0,05 levels

Table 7: *Ascochyta rabiei* pathotype groups characterised by inoculation of 3 differential chickpea lines

Isolate	Line ILC 1929	Line ILC 482	Line ILC 3279	Mean	Pathotype
M1	7,3±0,82	2,7±0,82	3,3±0,82	4,4 ^{de}	I
M2	9±0,00	7±0,00	6,7±0,82	7,6 ^a	III
B1	7,3±0,82	7,3±0,82	2,3±1,03	5,7 ^{bc}	II
B2	7±0,00	3±0,00	2,7±0,82	4,2 ^{de}	I
C1	9±0,00	6,7±0,82	3,3±0,82	6,3 ^b	II
C2	8±1,67	6,7±0,82	3±0	5,9 ^{bc}	II
C3	9±0,00	7,3±0,82	7±0,00	7,8 ^a	III
Z1	8,7±0,82	3±1,12	1,3±0,82	4,3 ^{de}	I
Z2	7±0,00	4,7±0,82	3,7±1,03	5,1 ^{cd}	I
Z3	8±1,67	2,3±1,03	1,3±0,82	3,9 ^e	I
A1	6,7±0,82	3,3±0,82	3±0,82	4,3 ^{de}	I
A2	8,7±0,82	5±0,00	3,3±0,82	5,6 ^{bc}	I
A3	7,3±1,51	7±0,00	4±1,10	6,1 ^b	II
R1	9±0,00	3,3±0,82	3±0,00	5,1 ^{cd}	I
R2	9±0,00	5±0,00	2,7±0,82	5,6 ^{bc}	I
R3	9±0,00	6±1,67	3±0,00	6,0 ^{bc}	II
Mean	8,1 ^a	4,9 ^b	3,3 ^c		

An inverse correlation between mycelium growth and sporulation was observed with a R value of -0.27 at $P = 0.05$. Vigorously growing strains such as C1, C2 or B1 had a lower sporulation rate than strains with slower growth such as B2.

Pathogenicity of *A. rabiei* Isolates: The pathogenic characterisation of *A. rabiei* isolates was performed with a set of 11 differential chickpea genotypes (Flip 9393 C, ILC 263, ILC 8068, ILC 7795, ILC 249, ILC 483, ILC 3996, ILC 484, ILC 1929, ILC 482 and ILC 3279). These cultivars were chosen because of their frequent use to test the aggressiveness of isolates. Artificial inoculation of *Ascochyta rabiei* isolates on this differential host range led to the production of typical symptoms namely lesions on leaves and stems and stem girdling. The symptom scores obtained from notations on individual plants 14 days after inoculation are shown in Table 5.

It can be seen that the isolates varied greatly in aggressiveness depending on the cultivars. Analysis of variance showed that the effects of plant genotype and fungal isolate as well as their interaction were highly significant for these two parameters (Table 6). The Newman-Keuls test at the 5% and 1% allows establishing homogeneous groups for the isolates.

The symptom score mean values for genotype and isolate (Table 5) showed that genotype ILC 263 was the most susceptible line and ILC 3279 the most resistant line. Isolate M2 was the most aggressive (index 7.45) against all accessions. Isolates C3 and R3 also showed high

aggressiveness with symptom scores of 7.23 and 6.40 respectively. Otherwise A1 and M1 were the least aggressive *Ascochyta* isolates (4.26 and 4.28 respectively).

In our investigation most of the chickpea lines were moderately resistant, with mean values below 5 but above 4.

The three ICARDA lines ILC 1929, ILC 482 and ILC 3279 were respectively susceptible, intermediate and resistant by their mean values. ILC 3279 was confirmed as the most resistant genotype with resistant disease reaction to all isolates except isolate M2 and C3.

This set of 3 differential chickpea genotypes (ILC 1929, ILC 482, ILC 3279) was used to determine the pathotypes of the algerian *A. rabiei* isolates, as described by Udupa *et al.* [18]. As shown in table 7, they could be classified into pathotypes I, II and III. Accordingly, nine isolates belonged to pathotype I, five isolates to pathotype II and two isolates to pathotype III. These two pathotype III isolates (M2 and C3) which have overcome resistance in ILC 3279 were also the most aggressive by mean values.

Characterization of Mating Types: Primers specific for mating type Mat1-1 and Mat1-2 were used in multiplex PCR experiments. Gel electrophoresis revealed the presence of 490 bp and 700 bp amplicons for MAT1-2 and MAT1-1, respectively (data not shown) and isolates could be unambiguously assigned to one of the two mating types. This analysis revealed that both mating types occur in northwestern Algeria (Table 5) and that the MAT1-1 genotype seemed more common than MAT1-2, in a ratio of 3:1.

DISCUSSION

The control of ascochyta blight is mainly dependent on the use of resistant cultivars due to the high cost of fungicide applications and their effect on environment in many countries. Identification of new sources of resistant requires knowledge of cultural, morphological pathogenic and genetic variation in pathogen. This study reveals the levels of variation in morphology, growth and aggressiveness among 16 isolates of *A. rabiei* from 6 different provinces in northwestern Algeria.

Despite the limited number of isolates, significant differences in pigmentation and growth on CSM DA medium were observed, even among isolates from a same region (Table 2).

Colony diameter of the sixteen test isolates on CSMDA medium varied, in agreement with other studies which demonstrated the variability of the mycelial growth of *A. rabiei* [31, 32].

Conidial size was also variable and was comparable to data obtained with Australian [11] and Indian isolates [31].

The same variability was observed for sporulation where the effect of isolate was statistically significant, indicating a genetic determinism for this trait. The origin of the isolates seemed to have some influence on sporulation. As can be seen in Figure 2, isolates from Mascara (C1, C2, C3) and Mostaganem (M1, M2) had much lower spore production than isolates from Relisane (R1, R2, R3) and Ain Defla (Z1, Z2, Z3). When mean values for sporulation were calculated for all isolates from one region, they differed among the regions. ANOVA revealed a significant effect of region at $P < 0.001$ (data not shown) and Newman-Keuls test showed that they could be classified into 4 groups (Table 4). An inverse correlation was observed between radial growth of the mycelium and spore production; isolates such as C1 and B1 with a high growth rate were among those with lowest sporulation. Our data are in agreement with others such as Grewal [33] who reported similar correlations between growth and sporulation for *A. rabiei* isolates from various regions in India. Such a negative correlation is indicative of a trade-off between vegetative growth and reproduction when limited resources are invested either in growth of mycelium or production of spores [34].

Similar variability in morphological and cultural characters among *A. rabiei* isolates have been reported from various countries [33, 35]. However, these variations did not correlate with the geographical origin and pathogenic variations in several of the earlier studies [36].

In addition to morphology and growth, a high variability of aggressiveness and pathogenicity has been reported for *A. rabiei* [13, 16, 17, 33, 37, 38]. While some of these authors characterised the pathogenic groups in races according to their virulence on different chickpea cultivars, others stated the difference in aggressiveness rather than in virulence [16, 39].

Our study revealed a high variability for disease reaction when the 16 isolates were inoculated on 11 chickpea genotypes. According to the 1 to 9 disease rating, seven chickpea genotypes were resistant with disease scores of 1 to 5 and four genotypes were susceptible with disease scores from 5.1 to 9. Eight among the 16 isolates can be considered as aggressive with mean disease scores above 5 and among these three were

highly aggressive with mean values higher than 6. Two of these highly aggressive isolates, isolates C3 and M2 from fields in Mascara and Mostaganem respectively, can be classified as pathotype III due to their ability to cause disease in chickpea line ILC3279. Our results showed that the predominant pathotype in north western Algeria was pathotype I. Pathotype I is also dominant in Turkey, followed by pathotype III [24]. Although in our present work inoculations of 11 chickpea lines were done differently and symptoms scored on individual plants, the susceptibility of line ICC-3996 to isolates C3 and M2 indicates that both isolates might even belong to pathotype IV as described for *A. rabiei* in Syria by Atik *et al.* [40]. However, Tuerkkan and Dolar [24] considered lines infecting ICC-3996 as pathotype III. Due to lack of data it is not possible to say if pathotype III in north-west Algeria occurs since a long time already or if it has appeared more recently and could be expected to spread more in the future, as it has been observed in Syria where a genetic shift towards more virulent strains over time and space was reported [40]. However, the occurrence of mating types 1-1 and 1-2 in Northwest Algeria and notably in the Mascara region where the pathotype III isolate C3 was detected, could favour spreading of the highly aggressive genotype.

Chickpea line ILC 3279 was distributed to farmers during the 1986-1987 campaign of a program of the Algerian government to stimulate intensification of crops. Our results show that this line can no longer be considered to be resistant in all circumstances. Notably in the Mascara and Mostaganem regions chickpea fields should be surveyed in order to avoid the spread of this pathotype to other regions. First experiments on fungicide efficiency have shown that fortunately pathotype III is very sensitive to chlorothalonil and difenoconazole (Mahiout, unpublished results).

Our results also show that the most aggressive isolates such as C3 and M2 produced only low amounts of spores whereas less aggressive isolates like B2 and R1 were sporulating abundantly. However, this tendency was not generalised, since the highly aggressive isolate R3 also produced high amounts of spores. In contrast to our observation, Grewal [33] and Kaur [41] reported that relatively fast growing and less sporulating *A. rabiei* isolates were less virulent than the abundantly sporulating isolates. In other studies, no relationships were observed between virulence of isolates, their geographical origin and morphological characteristics such as spore size, colony colour and radial growth *in vitro* [42].

It has been reported that the degree of pathogenicity of different isolates of *A. rabiei* in India was well correlated with the amount of phytotoxins they produced [41]. It would be interesting to study toxin production by the various Algerian isolates and to assess a putative correlation with aggressiveness.

At ICARDA sources of resistance to *Ascochyta* blight such as line ILC-3279 which showed high level resistance in several countries have been described [26]. It was well established that *A. rabiei* possesses variability and that pathotypes present in Pakistan and India are more aggressive than those prevalent in the Mediterranean region [43]. However, our results showed that some Algerian isolates were not less aggressive because some of them were able to cause disease on the resistant line ILC 3279. *Ascochyta rabiei* has a sexual stage and mating types 1-1 and 1-2 were identified in our study for isolates from north-western Algeria. MAT1-1 was more common than MAT1-2. The reason of its unequal distribution is not known. This finding is in line with the study of Nourollahi *et al.* [44] in which the majority of Iranian isolates belonged to Mat1-1 (64.08%) with the remainder (35.92%) in the western Iranian province. Both mating types have been detected in many countries including Italy, Portugal, Egypt, Morocco, Greece, Turkey, Tunisia, Spain, USA and Canada [9, 29, 45, 46]. The occurrence of both mating types in Algeria suggests that sexual reproduction might take place on crop residues and that the teleomorph might be an alternative source of inoculum. In addition, genetic recombination could easily lead to the appearance of new and more aggressive pathotypes.

These newly described highly aggressive pathotypes from Algeria should be included in national breeding programs and used for screening resistant genotypes originating from ICARDA and various other sources.

ACKNOWLEDGEMENTS

Part of this work was supported by project PHC Tassili 07 MDU 697. The authors thank Dr. Cécile Ben (UMR 5245 Ecolab, France) and Dr. Yassine Mabrouk (Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires Sidi Thabet, Tunisia) for helpful discussions, Pr. Miloud Halbouche (University of Mostaganem, Algeria) for assistance with statistical analysis and Dr Sabine Banniza and Cheryl Cho (University of Saskatchewan, Canada) for the gift of from *A. rabiei* DNA for comparison of mating type by PCR.

REFERENCES

1. Aslam, M.F.A. Shaheen, M.A. Abbas and A. Saba, 2006. Management of *Callosobruchus chinensis* Linnaeus through use of resistance in stored chickpea varieties. World Journal of Agricultural Sciences, 2(1): 82-84.
2. Esfahani, M.N., A. Mostajeran and G. Emtiazi, 2010. The effect of drought stress on nitrogenase and antioxidant enzymes activities in nodules formed from symbiosis of chickpea with two strains of *Mezorhizobium ciceri*. World Applied Sciences Journal, 10(6): 621-626.
3. Mohammadi, A., D. Habibi, M. Rohami and S. Mafakheri, 2011. Effect of Drought Stress on Antioxidant Enzymes Activity of Some Chickpea Cultivars. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 11(6): 782-785.
4. Kanouni, H., M. Khalily and R.S. Malhotra, 2009. Assessment of cold tolerance of chickpea at rainfed highlands of Iran. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 5(2): 250-254.
5. Qureshi, S.T., A.R. Abassi, A. Yasmeen, H. Bux, N.F. Memon and A. Buriro, 2014. Confirmation of salt tolerant Rhizobia through nodule soluble protein profiling by SDS-PAGE. World Applied Sciences Journal, 32(10): 2037-2041.
6. Benzohra, I.E., B. S. Bendahmane, M. Youcef Benkada and M. Labdi, 2015. Screening of 15 chickpea Germplasm accessions for resistance to *Ascochyta rabiei* in North West of Algeria. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 15(1): 109-114, 2015.
7. Iqbal, U., S.R. Malik, S.M. Iqbal, B. Ahmad and S. Nadeem, 2008. Evaluation of chickpea germplasm for resistance to *Ascochyta* blight. Pakistan Journal of Phytopathology, 20: 218-221.
8. Nene, Y.L. and M. Reddy, 1987. Chickpea diseases and their control. In M.C. Saxena & K.B. Singh (eds.), The chickpea (pp. 233-270). Oxfordshire. CAB International.
9. Navas-Cortés, J., E. Pérez-Artés, R. Jiménez-Díaz, A. Llobell, B. Bainbridge and J. Heale, 1998. Mating type, pathotype and RAPDs analysis in *Didymella rabiei*, the agent of *ascochyta* blight of chickpea. Phytoparasitica, 26: 199-212.
10. Reddy, M.V. and S. Kabbabeh, 1985. Pathogenic variability of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab., in Syria and Lebanon. Phytopathologia Mediterranea, 24: 265-266.

11. Udupa, S.M. and F. Weigand, 1997. Pathotyping of *Ascochyta rabiei* isolates of Syria. In S.M. Udupa & F. Weigand (eds.), DNA markers and breeding for resistance to ascochyta blight in chickpea. Proceedings of the Symposium on "Application of DNA Fingerprinting for Crop Improvement: Marker-assisted Selection of Chickpea for Sustainable Agriculture in the Dry Areas, Aleppo 1994, pp: 39-48.
12. Jan, H. and M.V. Wiese, 1991. Virulence forms of *Ascochyta rabiei* affecting chickpea in the Palouse. *Plant Disease*, 75: 904-906.
13. Porta Pulgia, A., P. Crino and Mosconi, 1996. Variability in virulence to chickpea of an Italian population of *Ascochyta rabiei*. *Plant Disease*, 80: 39-41.
14. Jamil, E.F., N. Sarwar, M. Sarwar, J.A. Khan, J. Geistlinger and G. Kahl, 2000. Genetic and pathogenic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. populations in Pakistan causing blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 57: 243-254.
15. Khan, M.S.A., M.D. Ramsey, R. Corbière, A. Infantino, A. Porta-Puglia Z. Bouznad and E.S. Scott, 1999. *Ascochyta* blight of chickpea in Australia: identification, pathogenicity and mating type. *Plant Pathology*, 48: 230-234.
16. Hamza, S., S. Samir, A. Rebai, R. Salah, G. Kahl and H. Moncef, 2000. Pathotype variation of the representative genotypes of *Ascochyta rabiei* in the Beja region. *Journal of Plant Pathology*, 82: 23-28.
17. Chongo, G., B.D. Gossen, L. Buchwaldt, T. Adhikari and S.R. Rimmer, 2004. Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. *Plant Disease*, 88: 4-10.
18. Udupa, S., F. Weigand, M. Saxena and G. Kahl, 1998. Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the ascochyta blight pathogen. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 299-307.
19. Chen, W., C.J. Coyne, T.L. Peever and F.J. Muehlbauer, 2004. Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of ascochyta blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*. *Plant Pathology*, 53: 759-769.
20. Du, W., X. Zhao, T. Raju, P. Davies and R. Trethowan, 2012. Identification of *Ascochyta rabiei* disease resistance in chickpea genotypes. *Euphytica*, 186: 697-704.
21. Singh, G., K.B. Singh and S. Kapoor, 1982. Screening for sources of resistance to *Ascochyta* blight of chickpea. *International Chickpea Newsletter*, 6: 15-17.
22. Benzohra, I.E., B.S. Bendahmane, M. Labdi and M. Youcef Benkada. 2013. Sources of resistance in chickpea germplasm to three pathotypes of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. In Algeria. *World Applied Sciences Journal*, 21(6): 873-878.
23. 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. Thèse de doctorat d'état, Université P. et M. Curie, Paris.
24. Türkkan, M. and F.S. Dolar, 2009. Determination of pathogenic variability of *Didymella rabiei*, the agent of ascochyta blight of chickpea in Turkey. *Turkish Journal of Agricultural and Forestry*, 33: 585-591.
25. Singh, K.B., G.C. Hawtin, Y.L. Nene and M.V. Reddy, 1981. Resistance in chickpea to ascochyta blight. *Plant Disease*, 65: 586-587.
26. Reddy M.V. and K.B. Singh, 1984. Evaluation of a world collection of chickpea gemplasm lines for resistance to ascochyta blight. *Plant Disease*, 68: 900-901.
27. Weising, K., D. Kaemmer, J. Epplen, F. Weigand, M. Saxena, G. Kahl, 1991. DNA fingerprinting of *Ascochyta rabiei* with synthetic oligodeoxynucleotides. *Current Genetics*, 19: 483-489.
28. White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J.W. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J. Sninsky & T.J. White (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and amplifications* (pp. 315-322). New York, NY, USA. Academic Press.
29. Barve, M.P., T. Arie, S.S. Salimath, F.J. Muehlbauer and T.L. Peever, 2003. Cloning and characterization of the mating type (MAT) locus from *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) and a MAT phylogeny of legumes-associated *Ascochyta* spp. *Fungal Genetics and Biology*, 39: 151-167.
30. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis, 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratories Press, pp: 874-895.
31. Basandrai, A.K., S. Pande, G. Krishna Kishore, J.H. Crouch and D. Basandrai, 2005. Cultural Morphological and Pathological Variation in Indian Isolates of *Ascochyta rabiei*, the Chickpea Blight Pathogen. *Plant Pathology Journal*, 21(3): 207-213.

32. Ozkilinc, H., O. Frenkel, S. Abbo, R. Eshed, A. Sherman, D. Shtienberg, R. Ophir and C. Can, 2010. A comparative study of Turkish and Israeli populations of *Didymella rabiei*, the ascochyta blight pathogen of chickpea. *Plant Pathology*, 59: 492-503.
33. Grewal, J.S., 1984. Evidence of physiologic races in *Ascochyta rabiei* of chickpea. In M.C. Saxena & K.B. Singh (eds.). *Proceedings of the Workshop on Ascochyta Blight and Winter Sowing of Chickpeas*, ICARDA, Aleppo, Syria, pp: 55-65.
34. Schmit, J.P., 2002. Trade offs between reproduction and mycelium production in the unit-restricted decomposer *Coprinus cinereus*. *Mycologia*, 94(1): 40-48.
35. Kaiser, W.J., 1973. Factors affecting growth, sporulation, pathogenicity and survival of *Ascochyta rabiei*. *Mycologia*, 65: 444-457.
36. Pande, S., K.H.M. Siddique, G.K. Kishore, B. Baaya, P.M. Gaur and C.L.L. Gowda, 2005. *Ascochyta* blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review of biology, pathogenicity and disease management. *Australian J. Agricultural Res.*, 56: 317-332.
37. Iqbal, S.M., A. Ghafoor, N. Ayub and Z. Ahmad, 2004. Pathogenic diversity in *Ascochyta rabiei* isolates collected from Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 36(2): 429-437.
38. Benzohra, I.E., B.S. Bendahmane, M. Labdi and M. Youcef Benkada, 2011. Identification of Pathotypes and Physiological Races in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., the agent of *ascochyta* blight in chickpea (*Cicer arietinum*) in Algeria. *World Applied Sciences Journal*, 15(7): 978-984.
39. Gowen, S.R., 1986. Investigation into variability in *Ascochyta rabiei* and resistance to the disease in chickpea. Report of Project R3712 funded by Overseas Development Administration and done in collaboration with the International Centre for Agriculture Research in Dry Areas. University of Reading, UK.
40. Atik, O., A. Seid, M.M. Abang, M. Imtiaz, A. Hamwieh, M. Baum, A. El-Ahmed, S. Murad and M. Yabarak, 2013. Pathogenic and genetic diversity of *Didymella rabiei* affecting chickpea in Syria. *Crop Protection*, 46: 70-79.
41. Kaur, S., 1995. Phytotoxicity of solanapyrones produced by the fungus *Ascochyta rabiei* and their possible role in blight of chickpea (*Cicer arietinum*). *Plant Science*, 109: 23-29.
42. Ali, S.R., S.M. Iqbal, U. Iqbal, A. Ghafoor and Akram A., 2009. Pathogenic diversity in *Ascochyta rabiei* (PASS.) Lab., of chickpea. *Pakistan Journal of Botany*, 41(1): 413-419.
43. Singh, K.B., M.V. Reddy and Y.L. Nene, 1984. International testing of chickpeas for resistance to *Ascochyta* blight. *Plant Disease*, 68: 782-4.
44. Nourollahi, K., M. Javannikkhah, M. Naghavi, M.R. Lichtenzveig and S.M. Okhovat, 2011. Genetic diversity and population structure of *Ascochyta rabiei* from the western Iranian Ilam and Kermanshah provinces using MAT and SSR markers. *Mycological Progress*, 10(1): 1-7.
45. Peever, T.L., S.S. Salimath, G. Su, W.J. Kaiser and J. Muehlbauer, 2004. Historical and contemporary multilocus population structure of *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) in the Pacific Northwest of the United States. *Molecular Ecology*, 13: 291-309.
46. Rhaiem, A., M. Cherif, P.S. Dyer and T.L. Peever, 2007. Distribution of mating types and genetic diversity of *Ascochyta rabiei* populations in Tunisia revealed by mating-type-specific PCR and random amplified polymorphic DNA markers. *Journal of Phytopathology*, 155: 596-605.

Chapitre III

Diversité génétique des isolats de *Ascochyta rabiei*

3.1. Résultats

La lutte contre l'antracnose du pois chiche dépend, entre autres méthodes, de l'utilisation de cultivars résistants, en raison du coût élevé des applications de fongicides et leurs effets sur l'environnement. L'identification de sources de résistance nécessite des connaissances sur la variabilité génétique de l'agent pathogène.

Les études sur les populations du pathogène *A. rabiei* ont montré des variations considérables dans l'agressivité des isolats mais les pathotypes sont peu définis (Udupa et al., 1998). Des marqueurs génétiques adaptés sont nécessaires pour l'analyse de la diversité génétique des pathotypes. Parmi ceux-ci, les microsatellites sont utilisés actuellement par de nombreux chercheurs pour caractériser des champignons pathogènes, car ils sont abondants, co-dominants et distribués à travers le génome. Ils requièrent de petites quantités d'ADN en plus d'être hautement polymorphiques (Zane et al., 2002).

L'étude sur les amorces microsatellites nous permettra d'identifier d'éventuelles corrélations entre les profils génétiques observés parmi nos isolats et les caractéristiques culturales, morphologiques et pathogéniques observées précédemment.

3.1.1. Analyse de la pureté de l'ADN

Les différentes extractions d'ADN réalisées sur les isolats donnent lieu à une variation de leur concentration ainsi qu'à des rapports 260/230 et 260/280 selon les isolats. Le rapport 260/280 détermine la qualité de l'ADN extrait, étape importante pour obtenir des bandes électrophorétiques nettes pour la suite des études sur le séquençage des régions ITS et des études de polymorphisme par les SSR.

Aussi pour respecter les normes, nous avons d'abord vérifié la pureté de l'ADN pour chaque isolat (Tab. 31). Pour l'isolat M1, nous avons réalisés plusieurs lavages à l'alcool afin d'obtenir une bonne pureté de l'ADN extrait.

3.1.2. Séquençage des régions ITS

Les bandes des ADN_r de 16 isolats de *Ascochyta* de pois chiche ont été utilisés pour établir l'identité des isolats testés et déterminés par les caractéristiques morpho- culturales. L'amplification de l'ADN_r avec une paires d'amorces universelles ITS1 et ITS4 a donné un

seul amplicon d'environ 550 pb qui, après séquençage a révélé que les séquences d'isolats testés se composent de 510 à 645 pb (Fig. 34).

Tableau 31: Résultats du dosage de la concentration de l'ADN *

Isolat	Concentration (µg/µl)	Rapport 260/230	Rapport 260/280
C1	3,03	1,93	2,1
C2	2,1	1,98	2,02
C3	3,05	1,98	2,01
B1	2,80	2,18	2,11
B2	3,30	2,02	2,12
A1	1,82	2,07	2,11
A2	2,00	2,28	2,13
A3	4,32	1,67	1,92
Z1	0,88	1,6	2,09
Z2	1,90	1,51	2,04
Z3	2,83	1,71	2,02
M1	1,51	1,21	1,59
M2	2,06	1,93	2,01
R1	4,19	1,86	1,98
R2	4,33	1,95	2,05
R3	7,57	1,85	1,96

*Appareil spectrophotomètre de type GeneQuant. Pro.RNA/DNA calculator.

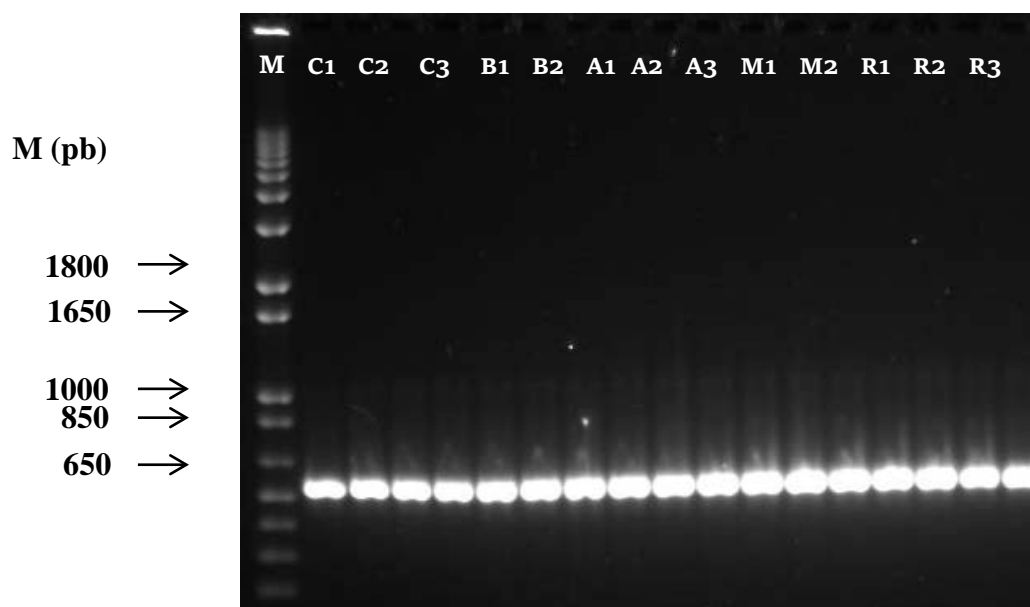


Figure 34: Profils électrophorétiques sur gel d'agarose indiquant l'amplification par PCR des régions ITS1 et ITS4 de l'ADN des différents isolats de *Ascochyta rabiei*. (M= marqueur moléculaire : 1 kb. La dernière bande à droite correspond à la souche S2 : Souche de référence, *Ascochyta pisi*).

Après séquençage, des blast ont été réalisés dans la banque de données Genbank (Blast NCBI). Par les moyens d'analyse utilisés (séquence ITS et recherches BLAST) les isolats du champignon étudié ont été identifiés comme étant *Ascochyta rabiei* (annexe 11).

Les résultats de l'alignement des séquences de l'ITS de chaque souche montre entre 90 et 95 % d'homologie avec la séquence de *A. rabiei*. Ces résultats confirment ainsi l'identification moléculaire des isolats étudiés. Ces derniers constituent donc des souches appartenant à l'espèce *Ascochyta rabiei*.

3.1.3. Variabilité des isolats de *Ascochyta rabiei*

Les profils électrophorétiques générés par les amorces microsatellites testées montrent que le polymorphisme est plutôt faible, et la plupart des souches ne peuvent pas être distinguées les unes des autres.

Les profils électrophorétiques M13 générés par l'ADN de *A. rabiei* présentent six bandes majeures allant de 650 à 1.800 pb, ainsi que plusieurs signaux faibles (figure 30A). Toutes les souches de *A. rabiei* montrent l'amplification de six bandes et ont le même profil électrophorétique, mais des différences reproductibles à intensité relative de bande pourraient être observées (Fig. 35A).

Avec l'amorce (ATC)₅, tous les isolats montrent une amplification de quatre bandes dont la taille varie de 900 à 2000 pb (Fig. 35B), avec des intensités relatives pour les isolats Z1 et Z2.

L'amorce (GAA)₅ révèle plusieurs bandes de taille différentes allant de 550 à 2200 pb pour tous les isolats (Fig. 35C). Selon le nombre et la position de la bande amplifiée (mais sans prendre en compte les intensités relatives) trois groupes peuvent être distingués par leurs profils électrophorétiques. Le groupe 1 rassemble les isolats C1, C2, A1, A2, M1, M2 et R2, le groupe 2, les isolats C3, B1, B2, R3, Z1, Z2 et Z3 et le troisième, les isolats A3 et R1.

L'amplification avec l'amorce (TGTC)₄ révèle une bande ayant la même taille pour les 14 isolats, et deux ou trois bandes plus faibles, de différentes tailles pour les souches A1 et Z1 (Fig. 35D).

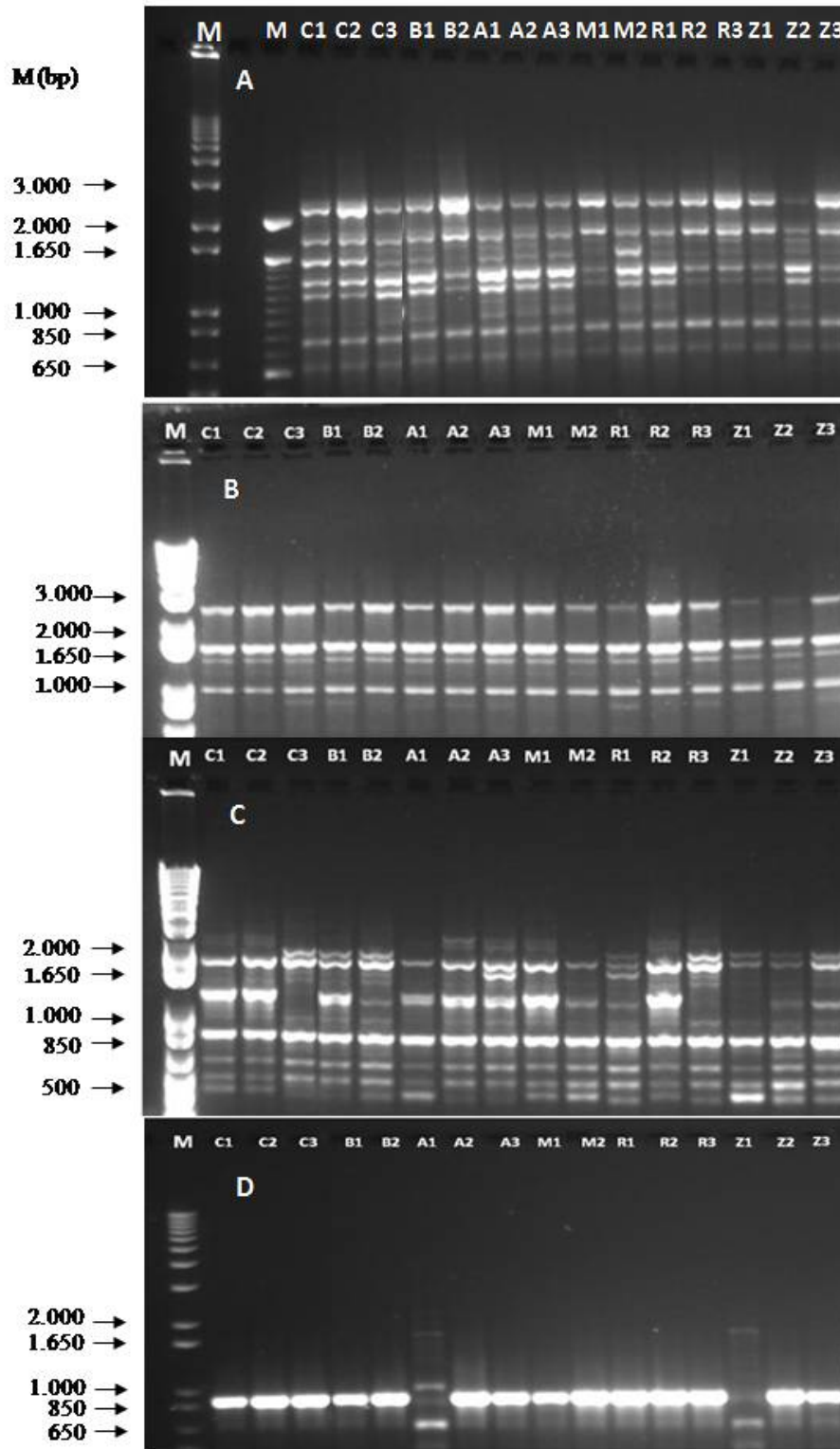


Figure 35 : Profils électrophorétiques de *Ascochyta rabiei* obtenus avec des amorces microsatellites. A : Primer M13, B : (ATC)₅ primers, C : (GAA)₅ primers, D : (TGTC)₄ primers. Marqueurs de poids moléculaire (1Kb et 100 pb, Invitrogen) la taille des bandes des marqueurs 1 Kb sont indiqués sur la gauche.

3.1.4. Détermination des groupes sexuels de compatibilité présents dans le nord-ouest algérien

Les amorces spécifiques pour les mating types Mat1-1 et Mat1-2 ont été utilisés dans des expériences de PCR multiplex. L'électrophorèse sur gel révèle la présence des amplicons de 490 pb et 700 pb pour MAT1-2 et MAT1-1, respectivement (données non présentées).

Les souches sont attribuées sans ambiguïté à l'un des deux types sexuels. Cette analyse révèle que les deux mating types existent dans le nord-ouest algérien (Tab. 32), et que le génotype MAT1-1 semble plus fréquent que MAT1-2, avec une proportion de 3/1.

Tableau 32: Distribution des mating types de *A. rabiei* dans différentes régions de l'ouest algérien.

Régions	Isolats	Mating type
Mascara	C1	MAT1-1
	C2	MAT1-2
	C3	MAT1-2
Aïn Temouchent	A1	MAT1-2
	A2	MAT1-1
	A3	MAT1-2
Aïn Defla	Z1	MAT1-1
	Z2	MAT1-2
	Z3	MAT1-2
Relizane	R1	MAT1-1
	R2	MAT1-1
	R3	MAT1-1
Sidi Bel Abbes	B1	MAT1-1
	B2	MAT1-1
Mostaganem	M1	MAT1-1
	M2	MAT1-1

3.2. Discussion

Les isolats du champignon ont été identifiés comme *A. rabiei* par les moyens d'analyse des séquences des régions ITS et les recherches BLAST effectuées par rapport aux séquences publiées.

Dans des études similaires, les marqueurs microsatellites ont révélé un haut niveau de polymorphisme parmi les isolats de *A. rabiei*, c'est le cas en Tunisie, en Australie, aux USA, de la Turquie, du Pakistan, de la Syrie et de l'Inde (Peever et al., 2004 ; Rhaiem et al. 2008 ; Varshney et al., 2009 ; Geitslinger et al., 2000 ; Bayraktar et al., 2007). Seuls les marqueurs SSR sont rapportés pour différencier le pathotype III et le pathotype IV (Imtiaz et al. , 2011). Par contre les auteurs ne signalent pas un profil pour le pathotype II. Par ailleurs, les travaux de Ali et al. (2013) ont démontré que les amorces URP (Universal Rice Primer) étaient très polymorphiques et différenciaient le pathotype I (faiblement agressif) des pathotypes hautement agressifs III et IV.

La forme *Didymella rabiei* est présente dans l'ouest algérien et les mating type 1-1 et 1-2 sont identifiés. Le MAT1-1 est plus commun. Nos résultats sont en accord avec l'étude effectuée par Nourollahi et al. (2011) dans la province ouest iranienne où la majorité des isolats appartiennent à MAT1-1 (64,08%) contre 35,92 % pour MAT1-2.

Les types MAT1-et MAT1-2 sont signalés dans plusieurs régions de culture de pois chiche dans le monde (Armstrong et al., 2001 ; Atik et al., 2011) alors que dans d'autres pays seul le MAT-1 a été signalé.

L'apparition des mating types 1-1 et 1-2 dans le nord-ouest de l'Algérie et notamment dans la région de Mascara et de Mostaganem où le pathotype III est détecté, pourrait favoriser la propagation de descendance hautement agressive.

Par ailleurs le test de PCR spécifique MAT est utilisé dans la détermination rapide du type sexué chez les populations de *A. rabiei* et la détection de l'introduction d'un second mating type dans une région donnée (Peever et al., 2004 ; Bayraktar et al., 2007).

L'étude de la distribution des deux mating types devrait à l'avenir concerner toutes les zones de culture de pois chiche en Algérie car on sait que les ascospores du téléomorphe représentent une descendance recombinante qui pourrait contribuer à une augmentation de la diversité génotypique dans les populations de *A. rabiei*. Cette variation est potentiellement

adaptative, ce qui permet à l'agent pathogène d'évoluer en virulence accrue sur les cultivars résistants et / ou de développer une résistance aux fongicides (Sharma et Ghosh., 2016).

En outre, les gènes MAT ont été proposés comme régions du génome potentiellement utiles pour la reconstruction phylogénétique et les études de variabilité génétique.

Chapitre IV

Caractérisation de l'interaction *Ascochyta rabiei*/*Medicago truncatula*

4.1. Résultats

Bien que la lutte chimique contre l'antracnose soit efficace, les semis d'hiver exposent la culture de pois chiche à un risque élevé de la maladie, le nombre de traitements phytosanitaires nécessaires à la protection de la culture constitue pour l'agriculteur une contrainte économique majeure, en raison du coût élevé des produits. Par ailleurs, la protection de l'environnement impose une utilisation moins massive des pesticides. Des lignées de pois chiche tolérantes ou résistantes ont été créées par les sélectionneurs mais leur résistance est vite surmontée par le pathogène.

La lutte génétique constitue donc le meilleur moyen de lutte contre cette maladie. Cependant jusqu'à présent aucun gène de résistance contre le pathogène n'a été cloné. La taille et la complexité du génome du pois chiche constitue des limites majeures qui empêchent sa réalisation.

M. Truncatula a été utilisée comme première plante modèle de légumineuses. Elle est autogame, possède un cycle de vie court (6 mois) et diploïde ($2n = 16$) et un petit génome (500 Mbps), ce qui simplifie les études sur les mécanismes génétiques des réponses aux agents abiotiques et biotiques (Barker et al., 1990). Son utilisation avec les outils génomiques actuellement disponibles pourraient lever ces limites relatives au pois chiche.

D'ailleurs des ressources génomiques et génétiques de cette plante modèle sont largement exploitées pour caractériser les interactions *M. truncatula*-pathogènes. Cependant, le couple pathosystème *M. truncatula*- *A. rabiei* n'a fait l'objet, à notre connaissance, d'aucune description ni d'aucune publication. Aussi, il faut d'abord montrer que cette plante est un hôte pour *A. rabiei* afin de pouvoir y étudier les mécanismes de défense que cette plante pourrait mettre en place contre ce pathogène.

Le contact de la plante avec un agent pathogène ou d'autres types de stress, déclenche chez la plante une réaction immédiate au niveau moléculaire qui conduit à l'activation des gènes de défense. La caractérisation précise des produits de ces gènes permet d'établir l'existence de plusieurs grandes catégories de composés tels que les composés structuraux, les protéines de défense incluant les enzymes, les protéines de stress et les inhibiteurs et les

composés issus du métabolisme secondaire. Toutes ces molécules exercent un rôle antimicrobien direct ou indirect.

Après avoir montré que *M. truncatula* est une plante hôte pour *A. rabiei*, une étude sur les mécanismes de résistance à travers l'expression de quelques gènes de défense est réalisée.

4.1.1. *Medicago truncatula* est une plante hôte pour *Ascochyta rabiei*

4.1.1.1. Symptomatologie de la maladie sur plantules entières

Des études sur la spécialisation parasitaire ont montré que *A. rabiei* pouvait infecter d'autres espèces de légumineuses en dehors du pois chiche (Kaiser, 1990 ; Montorsi et al., 1992). Kaiser (1997a) a isolé le champignon à partir de nombreuses légumineuses telles que la luzerne (*Medicago sativa*), le pois (*Pisum sativum*) et la lentille (*Lens culinaris*). Par ailleurs, à notre connaissance aucune étude n'a jusqu'à présent décrit l'interaction entre *Ascochyta rabiei* et *M. truncatula*. Nous avons donc d'abord démontré qu'il existe bien un lien d'interaction entre *A. rabiei* et *M. truncatula*.

Pour étudier la réaction de *M. truncatula* vis-à-vis de *A. rabiei*, des inoculations sont réalisées d'abord sur des plantes entières. Les symptômes apparus sur les plantules inoculées ne sont pas présents chez le témoin (Fig. 36).



Figure 36: Symptômes provoqués par *A. rabiei* sur les plantules de A17 (A) et de F83005.5 (B) (T= témoins traités à l'eau distillée stérile).

Les symptômes (Fig. 37 et 38) apparaissent dès le 2ème jour sur les lignées A17 et F83005.5. Les folioles s'enroulent d'abord vers leurs faces inférieures, puis les pétioles se courbent ou se cassent. Les folioles perdent ensuite leur chlorophylle et deviennent membraneuses et transparentes. Dans le cas le plus sévère (A17) les plantes flétrissent. La

plupart (70%) des plantes de A17 sont mortes à la fin de l'expérience (après 9 jours), mais les plantules restent vivantes chez F83005.5, même au-delà du 20^{ème} jour (arrêt des observations) et développent d'autres feuilles. Pour confirmer l'action de *A. rabiei* dans l'infection des plantules inoculées, nous avons établi un postulat de Koch.

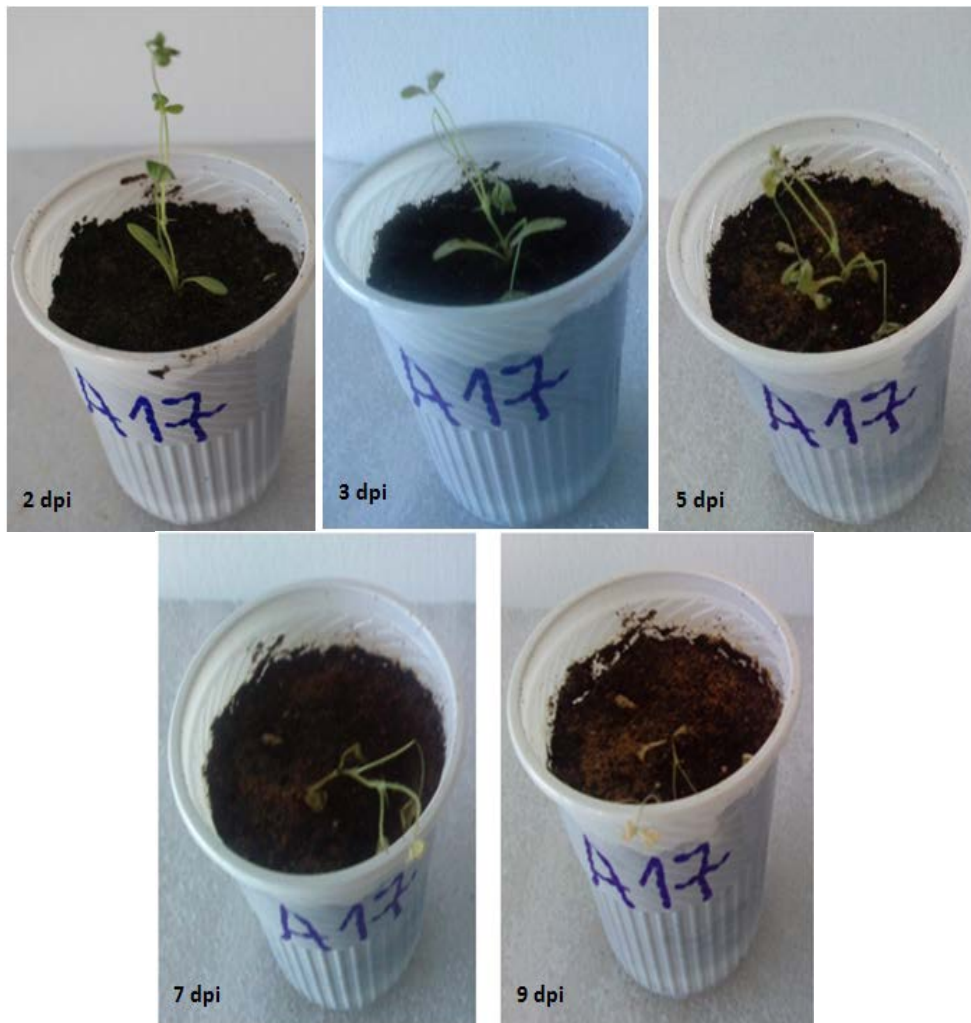


Figure 37 : Evolution des symptômes chez les plantules de la lignée A17 inoculées avec *A. rabiei* (10^6 spores/ml), après 2, 3, 5, 7 et 9 dpi.

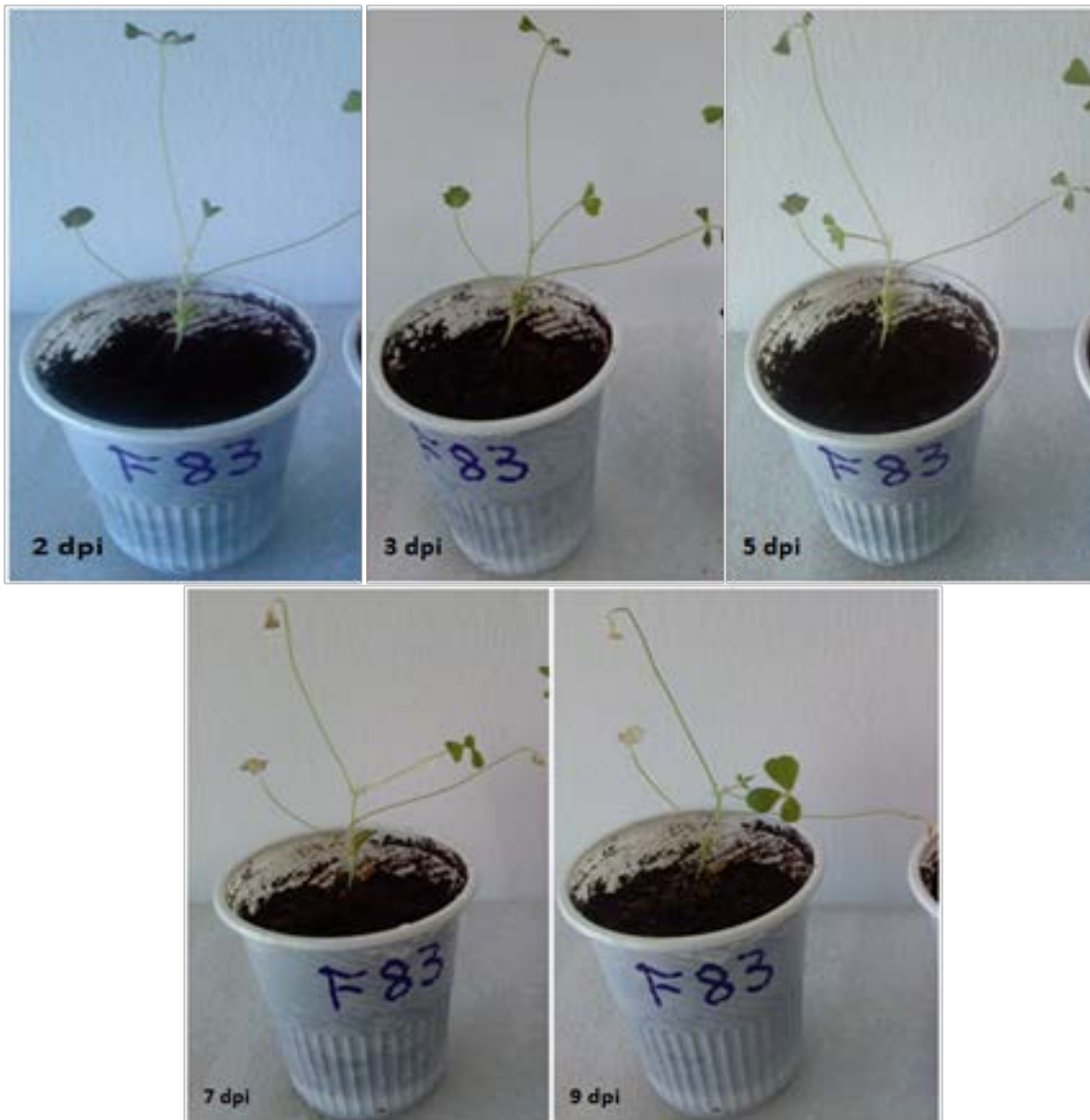


Figure 38: Evolution des symptômes chez les plantules de la lignée F83005.5 inoculées avec *A. rabiei* (10^6 spores /ml), après 2, 3, 5, 7 et 9 dpi.

Nos expériences montrent que la lignée F83005.5 est moins sensible que la lignée A17. En effet, la figure 39 indique clairement, à partir de 3 dpi, qu'il existe une différence d'au moins un indice sur l'échelle de la maladie entre les lignées A17 et F83005.5. L'écart entre les deux lignées atteint une valeur maximale de 1,86 points à 9 dpi. Les résultats du test de Newman-Keuls au seuil de 5 % montrent une différence significative entre les deux lignées à 3, 7 et 9 dpi (Tab. 33). En revanche, à 2 dpi, les résultats statistiques ne montrent aucune différence entre les deux lignées (Fig. 39, annexe 12).

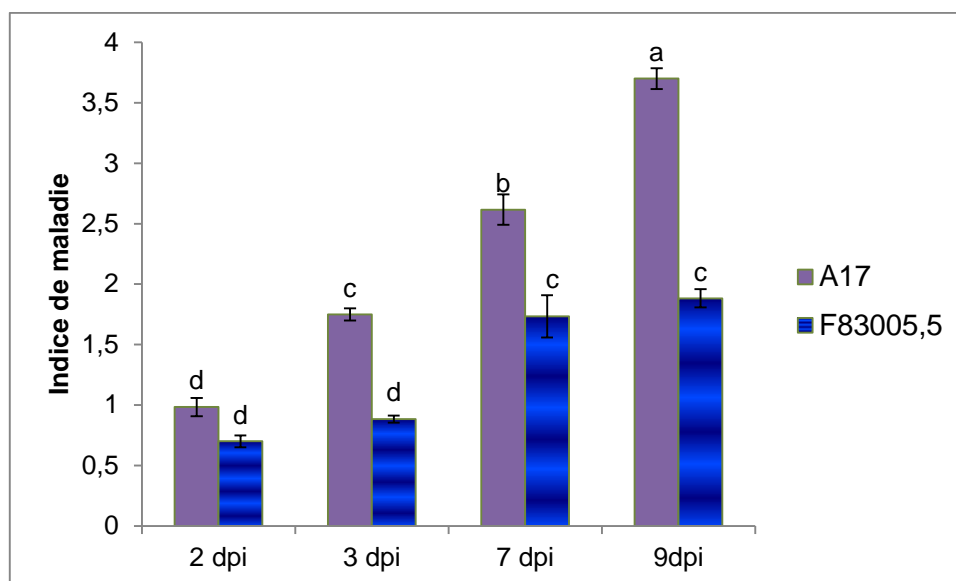


Figure 39: Développement des symptômes sur plantules entières (lignées A17 et F83005.5) inoculées avec *A. rabiei* (10^6 spores/ml). Les valeurs correspondent aux moyennes d'indices de la maladie obtenus sur 3 répétitions biologiques, chacune avec 20 répétitions techniques.

Tableau 33: Analyse de variance de l'indice de maladie des lignées de *Medicago truncatula* (plantules entières inoculées par *A. rabiei*).Première répétition biologique

	S.C.E	DDL	C.M.	Valeur F
Lignées	39,006	1	39,006	173,108*
Temps	92,969	3	30,99	137,531*
Lignées x Temps	12,769	3	4,256	18,889*
Erreur	34,25	152	0,225	

*Significatif à 0,05

Deuxième répétition biologique

	S.C.E	DDL	C.M.	Valeur F
Lignées	42,025	1	42,025	145,177*
Temps	82,4	3	27,467	94,885*
Lignées x Temps	11,475	3	3,825	13,214*
Erreur	44	152	0,289	

*Significatif à 0,05

Troisième répétition biologique

	S.C.E	DDL	C.M.	Valeur F
Lignées	30,625	1	30,625	120,596*
Temps	99,025	3	33,008	129,981*
Lignées x Temps	12,125	3	4,042	15,915*
Erreur	38,6	152	0,254	

*Significatif à 0,05

4.1.1.2. Symptomatologie de la maladie sur feuilles détachées

4.1.1.2.1. Evolution de la maladie

L'évolution des symptômes a été suivie chez les lignées A17 et F83005.5 pendant 20 jours, en utilisant l'échelle de notation de 0 à 5.

En début d'attaque la nécrose se limite à l'endroit du dépôt de la gouttelette d'inoculum. Un anneau chlorotique entoure chaque nécrose. A partir de 3 dpi, la nécrose gagne en surface sur la foliole, entraînant l'élargissement de l'anneau chlorotique qui évolue alors dans toute la surface de la foliole à partir de 12 dpi.

La figure 40 représente l'évolution de la maladie au cours du temps chez les feuilles détachées. Elle montre clairement que la lignée F83005.5 présente un retard dans le développement des symptômes à partir de 8 dpi. A partir de 12 dpi, la différence d'indices entre les deux lignées est supérieure à 1. Les symptômes sont moins importants à la fin de l'expérience chez la lignée F83005.5. Cette dernière semble moins affectée par l'attaque du parasite. Les analyses de variance montrent une différence significative entre les lignées. Il n'existe pas de différence significative entre les répétitions biologiques (Annexe 13).

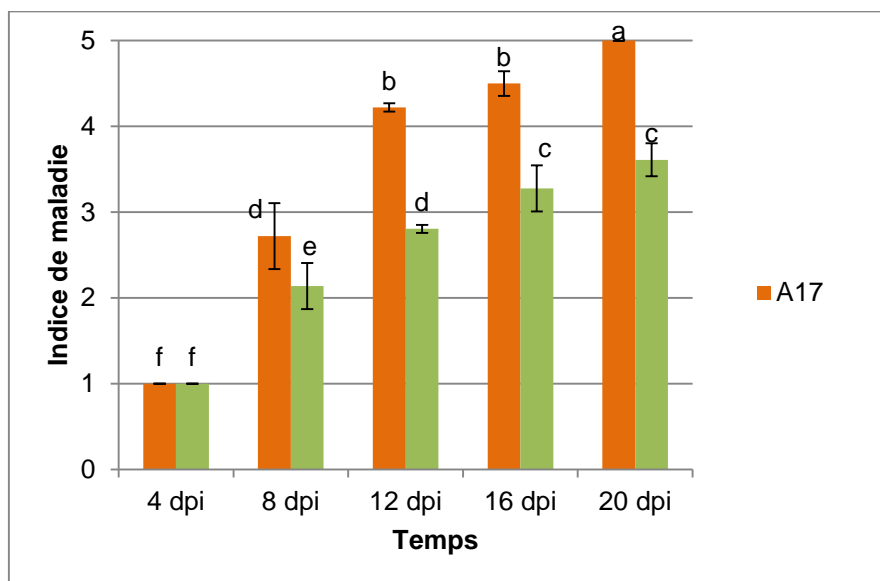


Figure 40: Développement de symptômes sur folioles de *M. truncatula* inoculées par *A. rabiei*. Les résultats montrent les moyennes de l'indice de maladie et les écarts types obtenus dans les inoculations des lignées A17 et F83005.5. Les moyennes sont établies sur 03 répétitions biologiques réalisées chacune avec 12 répétitions techniques.

4.1.1.2.2. Temps de latence

La figure 41 montre le nombre de pycnides notées chez deux lignées de *M. truncatula*. La lignée de pois chiche ILC 1929 est utilisée pour comparaison. Nous observons que le temps de latence est plus court chez A17. En effet, les premières pycnides apparaissent à 8 dpi chez A17 contre 12 dpi chez F83005.5. Chez la lignée de pois chiche (ILC 1929) le temps de latence est plus court puisque les pycnides sont visibles à partir de 4 dpi, bien avant leur apparition chez les lignées de *Medicago*.

Sous microscope, chez A17, des pycnides globuleuses, de couleur clair sont visibles à partir de 8 dpi, mais à ce stade elles ne sont pas encore mûres. Des pycnidiospores sont aussi visibles à l'intérieur des pycnides, à partir du 10^{ème} jour après inoculation. Les pycnides sont à ce moment plus volumineuses et ont une couleur marron foncé (Fig. 42). Leur taille est plus élevée chez la lignée A17 comparativement à F83005.5.

L'analyse de variance montre que les effets du génotype et du temps ainsi que leur interactions sont significatifs (Tab. 34). Le test de Newman-Keuls à 5% permet d'établir des groupes homogènes (Annexe 14).

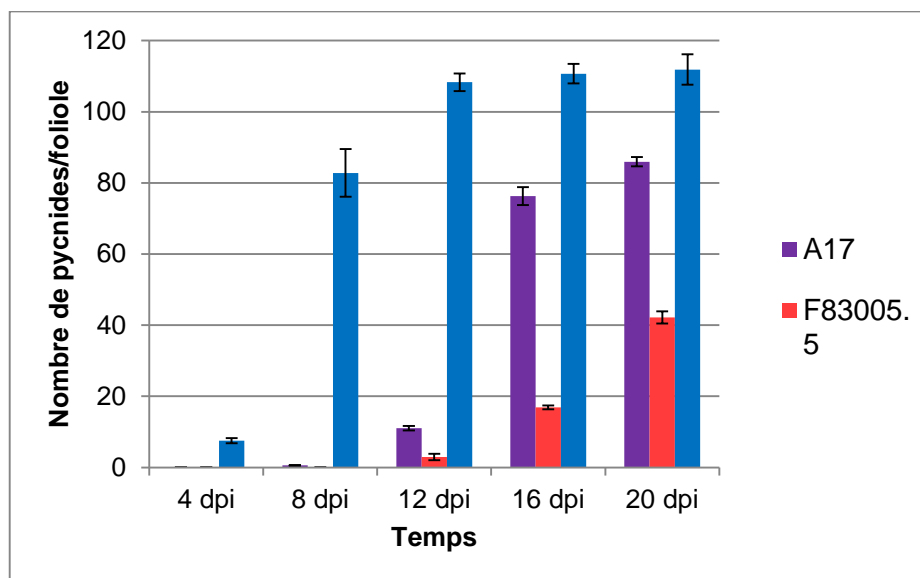


Figure 41: Cinétique d'apparition des pycnides chez les folioles de *M. truncatula* (lignées A17 et F83005.5) inoculées avec une goutte de 5 μ l (1×10^6 spores/ml) de *A. rabiei*. Les moyennes sont établies sur 03 répétitions biologiques réalisées chacune avec 12 répétitions techniques.

Tableau 34: Analyse de variance du nombre de pycnides sur folioles de *M. truncatula*

	S.C.E	DDL	C.M.	Valeur F
Lignées	643934,4	11	58539,49	145,696*
Temps	576008,5	4	144002,1	358,399*
Lignées x Temps	242865,1	44	5519,662	13,738*
Erreur	265183,6	660	401,793	

**Figure 42:** Aspect des pycnides sur foliole de *M. truncatula* après 10 jours d'inoculation par *A. rabiei* (1 goutte de 5 μ l à 10^6 spores/ml) (X60).

L'inoculation des feuilles détachées nous a permis de noter une différence nette entre les deux lignées. L'indice d'attaque et le nombre de pycnides les plus élevés sont noté chez A17. Les cellules épidermiques nécrosées observées au microscope sont plus nombreuses chez A17 que chez F83005.5 à 2dpi. A l'issu de ces constatations, nous pouvons affirmer que la ligné A17 est sensible et que F83005.5 est moins sensible.

4.1.1.2.3. Analyse microscopique des feuilles détachées de *M. truncatula* inoculées par *A. rabiei*

L'analyse microscopique est réalisée pour la cinétique de colonisation des tissus par le pathogène (Fig. 43). Les folioles inoculées, sans chlorophylle, permettent d'observer les structures du champignon colorées au bleu d'aniline. Il y'a des différences nettes entre la lignée A17 et la lignée F83005.5 durant les étapes de pré-pénétration.

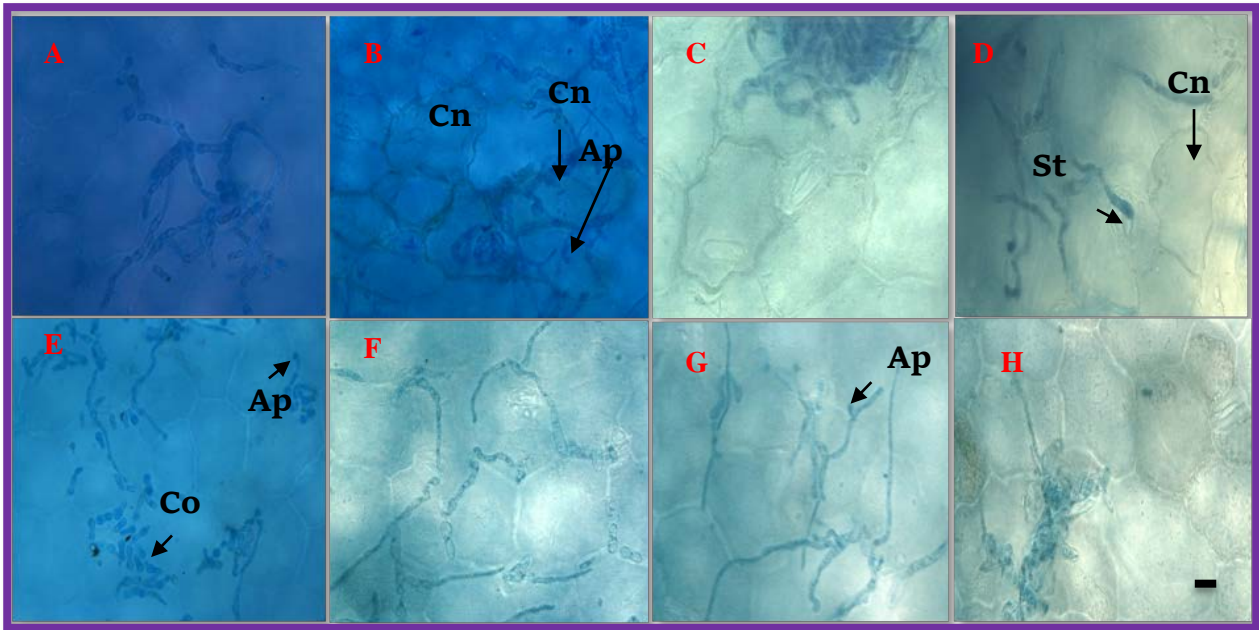


Figure 43 : Analyse microscopique des feuilles de deux lignées de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec un isolat de *Ascochyta rabiei*. Montage sous huile (x 630). Le mycélium est coloré avec du bleu d'aniline-lactophénol et les observations sont réalisées à 1dpi (A, E), 2 dpi (B, F), 3 dpi (C, G) et 10 dpi (D,H). La pré-pénétration du champignon est similaire entre A17 et F83005.5 avec un nombre de conidies germées supérieur chez la première lignée (A et E). Apparition de cellules nécrosées sous les appressorium dans le cas des folioles inoculées avec A17 (B) et absence de cellules nécrosées chez F83005.5 à 2 dpi (F). A 3 dpi, de nombreuses cellules sont nécrosées chez A17 (C) et seulement quelques une chez F83005.5 (G). A 10 dpi, toutes les cellules sont nécrosées au niveau du point d'inoculation chez A17 (D), en revanche chez F83005.5 ces dernières sont moins nombreuses. **Barre = 25µm**. Ap= appressorium ; Co= conidies ; Cn= cellule nécrosée ; St= stomate.

Les spores germent à la surface des folioles et forment des appressoriums entre 16 et 24 heures après l'inoculation chez A17 et entre 24 et 48 heures chez F83005.5 (Fig. 43A et B).

A 2 dpi, beaucoup de cellules épidermiques ou de mésophylle sont brunes et nécrosées (Fig. 43B) chez A17. Les appressoriums pénètrent directement par l'épiderme, entre les cellules ou par les stomates. En revanche, à ce stade, il n'y a pas encore de cellules nécrosées chez F83. A 3 dpi, de nombreuses cellules nécrosées sont observées chez A17 et les filaments mycéliens sont longs et enchevêtrés. Chez F83005.5 le mycélium est moins développé et il y'a moins de cellules nécrosées (Fig. 43F). A 10 dpi, la majorité des cellules épidermiques sont mortes chez A17 (Fig. 43D) et de nombreuses pycnidies mûres remplies de pycnidiospores sont observées. En revanche, chez F83005.5, il y'a moins de cellules mortes (Fig. 43H) et les pycnidies sont également mûres. L'ensemble de ces observations

microscopiques indiquent que la différence de sensibilité entre A17 et F83005 serait liée à une différence dans la colonisation des tissus.

Les observations microscopiques montrent que le champignon forme des appressoriums qui pénètrent dans la foliole de 3 façons différentes: à travers les stomates, directement à travers l'épiderme ou entre les cellules épidermiques qui semble-t-il la voie la plus empruntée.

4.1.2. Modification de l'expression des gènes de défense chez *Medicago truncatula* après inoculation avec *A. rabiei*

Pour étudier les mécanismes de défense potentiellement mis en place dans les folioles de plantes (lignées A17 et F83005.5), nous avons utilisé la technique des gènes induits pendant l'interaction de *M. truncatula* avec *R. solanacearum* dans des études préliminaires effectués au laboratoire Ecolab de Toulouse (résultats non publiés) et de l'interaction de cette plante avec *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* (Ramirez-Suero, 2009), avec *Colletotrichum trifolii* (Ameline-Torregrosa *et al.*, 2004), ainsi qu'une expression des gènes CHIT et PAL détecté en microarray suite à l'inoculation par *R. solanacearum* (M.F. Jardinaud et L. Gentzbittel, communication personnelle).

La figure 44 montre les facteurs d'induction et de répression des gènes des PR protéines et de l'enzyme Pi20 protéase à sérine folioles inoculées avec le pathogène et les folioles témoins traitées à l'eau distillée stérile. Des analyses statistiques ont été réalisées en vue de déceler les effets significatifs (Tab. 35, 36, 37 et 38, annexe 15).

L'inoculation avec *A. rabiei* a modifié l'expression de gènes liés à la défense dans les folioles de *M. truncatula*, L'expression du gène de la Pi20 est induit significativement au même moment (2 dpi) chez A17 et F83005.5.

Les protéines de défense PR5 et Chit ont montré des profils d'expression différents chez les deux lignées. L'induction de l'expression du gène PR5 a eu lieu de façon significative à 3 dpi chez la lignée F83005.5, avec un facteur d'induction de 4,7, alors que son profil est resté plus ou moins stable par rapport au témoin chez A17.

L'induction du gène codant la chitinase est plus précoce chez A17, un facteur d'induction de 2,47 est noté à 2 dpi. En revanche chez F83005.5 son induction a eu lieu à 3 dpi est son facteur d'induction est légèrement inférieur (1,83). Les gènes codant pour les

protéines de défense PR1 et β , 1-3 Glucanase et le gène Pi20 inhibiteur des protéinases à sérine ont montré des profils d'expression similaires chez les deux lignés (Fig. 44 et 45).

L'induction de l'expression du gène PR1 a eu lieu au même moment, soit à 2 dpi, pour A17 et F83005.5 avec des facteurs d'induction de 2,57 et 2,43 respectivement.

Pour le gène codant pour la PR10, il n'y a pas de changement significatif dans son expression, puisque celui-ci reste stable pour les deux lignées malgré les différences statistiques entre celles-ci.

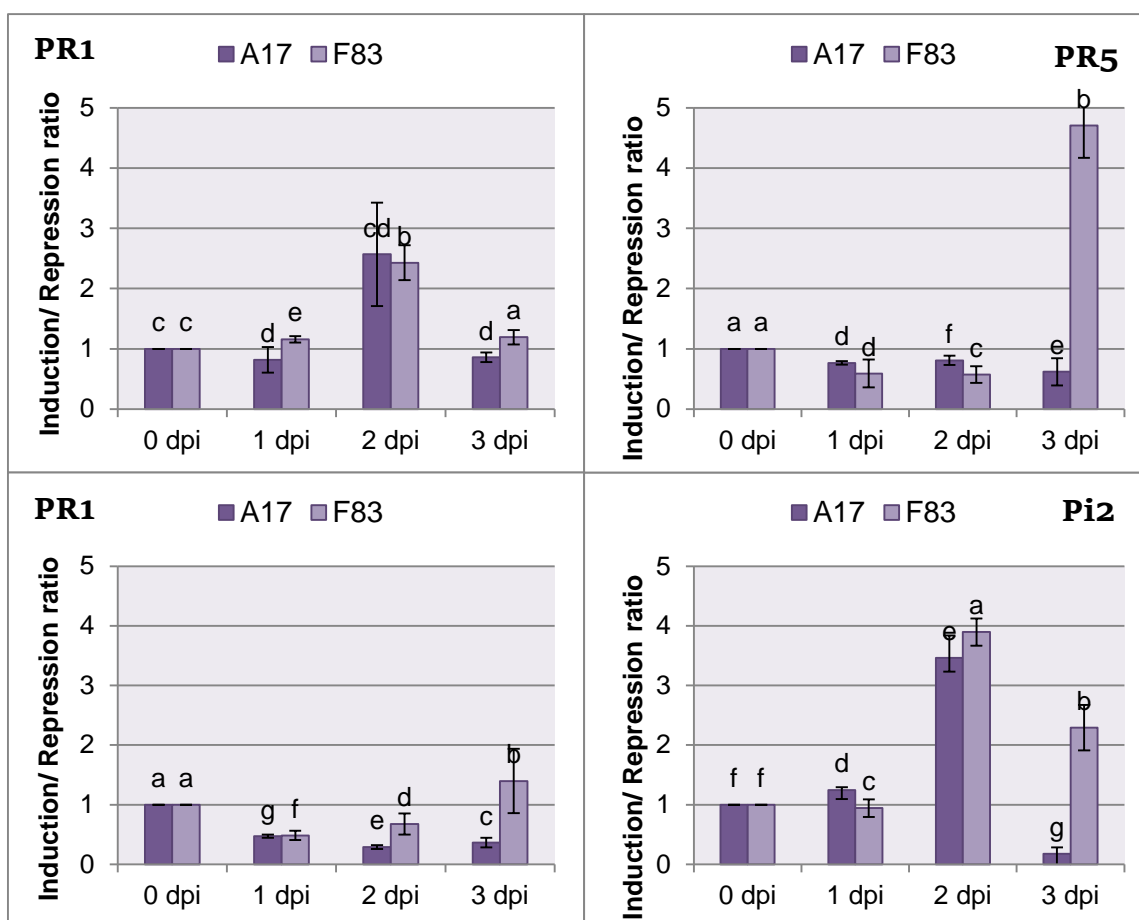


Figure 44: Expression des gènes de défense chez les folioles de *M. truncatula* inoculées avec *A. rabiei*. L'expression de gènes a été évaluée par qrt-PCR. Les résultats montrent les facteurs d'induction ou de répression de l'expression des gènes chez les plantes inoculées par rapport aux témoins à 0 dpi, 1 dpi, 2 dpi et 3 dpi. Les gènes représentés sur cette figure sont : les protéines PR1, PR5, PR10 et l'inhibiteur de protéase à sérine (Pi20).

Analyse de variance de l'expression des gènes PR1, PR5, PR10 et Pi20

Tableau 35 : Gène PR1

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F
Gène	5571,27	1	5571,26	64767,2**
Lignée	5,573	1	5,57	64,78**
Traitement	2,456	1	2,456	28,54**
Temps	11,22	3	3,739	43,47**
Gene x lignée	19,17	1	19,167	222,81**
Gène x traitement	0,317	1	0,317	3,68**
Gène x Temps	37,22	3	12,40	144,22**
Lignée x traitement	4,23	1	4,23	49,17**
Lignée x temps	13,89	3	4,631	53,84**
Traitement x temps	6,095	3	2,032	23,62**
Erreur	13,76	160	0,086	

Tableau 36 : Gène PR5

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F
Gène	1132,413	1	1132,413	23383,26**
Lignée	20,583	1	20,583	425,02**
Traitement	2,428	1	2,428	50,13**
Temps	56,855	3	18,952	391,34**
Gene x lignée	166,642	1	166,642	3441,00**
Gène x traitement	0,017	1	0,017	0,35*
Gène x Temps	299,519	3	99,84	2061,59**
Lignée x traitement	3,709	1	3,709	76,59**
Lignée x temps	25,406	3	8,469	174,86**
Traitement x temps	7,246	3	2,415	49,87**
Erreur	7,749	160	0,048	

Tableau 37 : Gène PR10

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F
Gène	392,162	1	392,16	10021,13**
Lignée	1,027	1	1,027	26,232**
Traitement	2,292	1	2,292	58,558**
Temps	190,976	3	63,659	1626,71**
Gene x lignée	32,775	1	32,775	837,51**
Gène x traitement	6,308	1	6,308	161,18**
Gène x Temps	323,925	3	107,975	2759,15**
Lignée x traitement	11,751	1	11,751	300,28**
Lignée x temps	0,357	3	0,119	3,04**
Traitement x temps	16,001	3	5,334	136,30**
Erreur	6,261	160	0,039	

Tableau 38 : Gène Pi20

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F
Gène	3582,975	1	3582,975	60459,81**
Lignée	692,743	1	692,743	11689,48**
Traitement	3,76	1	3,76	63,44**
Temps	304,705	3	101,568	1713,88**
Gene x lignée	74,641	1	74,641	1259,5**
Gène x traitement	2,043	1	2,043	34,478**
Gène x Temps	153,555	3	51,185	863,71**
Lignée x traitement	8,669	1	8,669	146,28**
Lignée x temps	289,133	3	96,378	1626,30**
Traitement x temps	111,373	3	37,124	626,44**
Erreur	9,482	160	0,059	

*= significatif à 0,01 ; **= hautement significatif à 0,05 ; NS=non significatif

Concernant les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes (Fig. 45), le gène PAL ne montre pas de modification significative dans son expression. Aussi, pour le gène de la flavone synthase et la chorismate synthase (synthèse de la phénylalanine) nous n'observons pas aussi de changement significatif dans leur niveau d'expression chez les deux lignées. Même si les résultats statistiques montrent des différences significatives entre les deux lignées (Tab.39, 40 et 41, annexe 15).

L'expression du gène de la β , 1-3-glucanase est induite à 1 dpi pour les deux lignées. Son expression est relativement plus significative chez A17 chez laquelle le facteur d'induction est de 3,40 contre 1,76 pour F83005.5. L'induction de l'expression du gène Chit est différente chez les deux lignées. Les résultats statistiques montrent une différence hautement significative dans l'expression du gène par rapport au témoin (Tab.42 et 43) et entre les lignées.

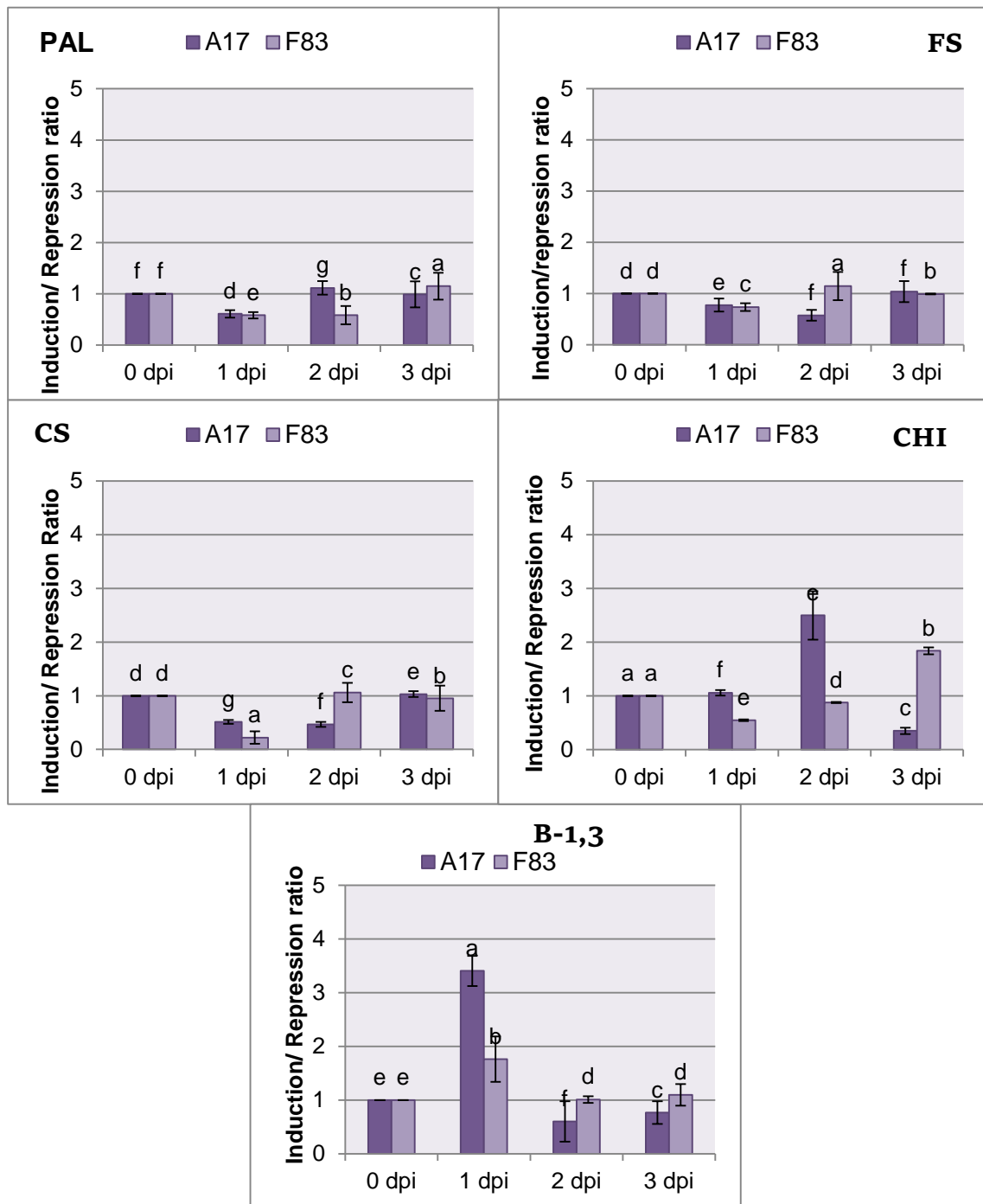


Figure 45: Expression des gènes de défense chez les folioles de *M. truncatula* inoculées avec *A. rabiei* (R3). L'expression de gènes a été évaluée par qrt-PCR. Les résultats montrent les facteurs d'induction ou de répression des plantes inoculées par rapport au témoins à 0 dpi, 1 dpi, 2 dpi et 3 dpi. Les gènes représentés sur cette figure sont : la phenylalanine ammonia lyase (PAL), la flavone synthase (FS) et la chorismate synthase (CS), la chitinase (CHIT) et la β -1-3 glucanase.

Analyse de variance de l'expression des gènes PAL, FS, CS et Chit

Tableau 39 : Gène PAL

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F
Gène	4332,454	1	4332,454	95202,43**
Lignée	11,739	1	11,739	257,95**
Traitement	0,009	1	0,009	0,20*
Temps	44,723	3	14,908	327,57**
Gene x lignée	10,972	1	10,972	241,09**
Gène x traitement	0,786	1	0,786	17,264**
Gène x Temps	23,968	3	7,989	175,56**
Lignée x traitement	3,144	1	3,144	69,09**
Lignée x temps	19,55	3	6,517	143,20**
Traitement x temps	11,907	3	3,969	87,22**
Erreur	7,281	160	0,046	

Tableau 40 : Gène FS

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F
Gène	15253,54	1	15253,54	377913,2**
Lignée	55,454	1	55,454	1373,9**
Traitement	0	1	0	0 NS
Temps	2,811	3	0,937	23,211**
Gene x lignée	0,123	1	0,123	3,049**
Gène x traitement	0,365	1	0,365	9,049**
Gène x Temps	93,737	3	31,246	774,13**
Lignée x traitement	5,221	1	5,221	129,34**
Lignée x temps	20,943	3	6,981	172,96**
Traitement x temps	13,253	3	4,418	109,44**
Erreur	6,458	160	0,04	

Tableau 41 : Gène CS

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F
Gène	561,138	1	561,138	7499,69**
Lignée	1155,655	1	1155,65	15445,5**
Traitement	0,731	1	0,731	9,766**
Temps	37,854	3	12,618	168,64**
Gene x lignée	0,221	1	0,221	2,955*
Gène x traitement	4,206	1	4,206	56,21**
Gène x Temps	703,539	3	234,513	3134,29**
Lignée x traitement	3,172	1	3,172	42,40**
Lignée x temps	404,507	3	134,836	1802,10**
Traitement x temps	6,157	3	2,052	27,43**
Erreur	11,971	160	0,075	

Tableau 42 : Gène Chit

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F
Gène	1716,585	1	1716,58	30801,15**
Lignée	6,621	1	6,621	118,81**
Traitement	0,583	1	0,583	10,46**
Temps	359,596	3	119,86	2150,78**
Gene x lignée	17,953	1	17,953	322,13**
Gène x traitement	0,028	1	0,028	0,51 NS
Gène x Temps	526,853	3	175,62	3151,16**
Lignée x traitement	4,287	1	4,2	76,93**
Lignée x temps	2,695	3	0,898	16,12**
Traitement x temps	9,595	3	3,198	57,39**
Erreur	8,917	160	0,056	

Tableau 43 : Gène β -1,3-Glucanase

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F
Gène	3247,488	1	3247,488	62907,12**
Lignée	2,853	1	2,853	55,257**
Traitement	2,177	1	2,177	42,161**
Temps	66,939	3	22,313	432,227**
Gene x lignée	29,11	1	29,11	563,897**
Gène x traitement	0,653	1	0,653	12,651**
Gène x Temps	45,937	3	15,312	296,615**
Lignée x traitement	7,043	1	7,043	136,429**
Lignée x temps	23,526	3	7,842	151,908**
Traitement x temps	15,139	3	5,046	97,754**
Erreur	8,26	160	0,052	

4.2. Discussion

Les tests d'inoculation réalisés sur les feuilles détachées et sur les plantules entières de *M. truncatula* ont permis de noter des symptômes et leurs évolution grâce à des échelles de notation de la maladie que nous avons établies. Nos observations macroscopiques et microscopiques, puis le réisolement du champignon montrent que *M. truncatula* est une plante hôte pour *A. rabiei*.

Les observations microscopiques montrent que le parasite forme des appressoriums et qu'il pénètre dans les folioles de trois façons différentes : à travers les stomates de la foliole, directement à travers l'épiderme, ou bien entre les cellules épidermiques. Cette dernière voie semble la plus utilisée. Selon Tenhaken (1992), les appressoriums de *A. rabiei* ne sont pas mélanisés. La pénétration dans les feuilles de pois chiche a lieu grâce à une action mécanique mais aussi grâce à l'action d'enzymes hydrolytiques. Le champignon se propage sous l'épiderme dans les espaces apoplastiques, avant d'envahir les cellules et causer un effondrement rapide et une plasmolyse des tissus foliaires.

Dans le cas du test sur les plantules entières, nous avons noté que dès le deuxième jour après l'inoculation, les folioles s'enroulent vers leur face inférieure. Les jours suivants celles-ci développent des chloroses puis deviennent membraneuses. Dans les cas les plus sévères, comme chez A17, certaines plantes flétrissent et meurent. A la fin des observations, soit après 20 jours, 100 % d'entre elles sont mortes chez A17, en revanche, celles de F83005.5 survivent au-delà de cette période et initient de nouvelles feuilles sans aucun symptôme.

De nombreux champignons pathogènes produisent un ou plusieurs métabolites toxiques qui sont nuisibles aux plantes. On pense que ces toxines jouent un rôle important dans les maladies des plantes, car elles peuvent toutes provoquer des symptômes de la maladie, si non, pour la plupart. On sait maintenant que les premiers symptômes causés par *A. rabiei* sont des epinasties et la perte de turgescence des cellules dans les pétioles et les jeunes tiges provoquant la mort des plantules attaquées (Alam et al., 1989 ; Zerroug et al., 2007).

Chez le pois chiche, les symptômes résultent de l'action de toxines appelées solanapyrones synthétisés par le champignon au cours de la pathogenèse (Höhl et al., 1991). Des Solanapyrones A, B et C ont été trouvées dans les filtrats de la culture de *A. rabiei* (Zerroug et al., 2007 ; Türkkan et al., 2011 ; Kim et al., 2015). Kim et al. (2015) ont montré que la solanapyrone A est phytotoxique pour plusieurs espèces de légumineuses et *Arabidopsis thaliana*.

L'universalité de la production de solanapyrone par *A. rabiei* soutient fortement l'importance des toxines pour le champignon et, en raison de leurs effets sur les hôtes, il semble probable qu'elles contribuent à la virulence ou peuvent même être à la base de la pathogénicité. Cependant, d'autres preuves à ce sujet consistent à développer des mutants déficients dans la production de toxines et la démonstration que leur capacité à causer une maladie (White et Chen, 2006).

Nous pensons que l'action des solanapyrones pourrait s'exercer sur les plantules et les folioles détachées de *M. truncatula*. *A. rabiei* est un parasite nécrotrophe, tuant les cellules végétales à l'avance du développement mycélien (Bahr et al., 2016).

Sur les plantes entières ou sur les feuilles détachées, la lignée A17 est très sensible alors que la F83005.5 l'est beaucoup moins. L'indice d'attaque et le nombre de pycnides les plus élevés sont notés chez A17. Il y'a le même nombre de pycnides formées chez A17 et la lignée de pois chiche sensible (ILC 1929). Le nombre de pycnides, donc de conidies, peuvent certainement influencer la gravité d'une épidémie au champ.

Lors des observations microscopiques des tissus des folioles colonisées, les cellules épidermiques nécrosées sont également plus nombreuses chez A17. A l'issue de ces tests, nous pouvons suggérer que cette lignée est très sensible par contre la F83005.5 semble moyennement sensible.

Nous pensons que le test des feuilles détachées, qui est plus facile à contrôler, peut être utilisé pour étudier les mécanismes de défense et peut être même pour cribler des collections de lignées. Ailleurs, ce même test est utilisé en laboratoire pour le criblage de lignées de pois chiche résistantes à l'antracnose (Dolar et al., 1994 ; Harijati et al., 2012).

Les lignées A17 et F83005.5 montrent souvent des différences de sensibilité vis-à-vis d'agents pathogènes. Les travaux de Ameline-Torregrosa et al. (2004) ont révélé que les lignées Jemalong (A17) et F83005.5 étaient respectivement résistantes et sensibles au champignon *Colletotrichum trifolii* race 1, agent de l'antracnose de la luzerne. Leur étude a montré aussi que la résistance est associée à une réponse hypersensible (HR) localisée, et à l'induction d'un plus grand nombre de gènes comparativement à la réponse dans la lignée sensible.

Le locus majeur responsable de la résistance aux 2 races du pathogène a été cartographié sur le chromosome 4 (Ameline-Torregrosa et al., 2008). Le gène RCT1 de ce

locus est ensuite cloné, ce qui confère à la luzerne sensible une résistance à l'antracnose (Yang *et al.*, 2008).

Des sources de résistance à d'autres agents pathogènes sont décrites chez *M. truncatula*, comme le *Phoma medicaginis* (Ellwood *et al.*, 2006; Djébali *et al.*, 2007; Djébali, 2013) et *Erysiphe pisi* (Ameline-Torregrosa *et al.*, 2008). Tous ces travaux montrent la puissance des outils génétiques et génomiques dont on dispose pour cette plante modèle.

Des travaux de screening de 28 souches de *R. solanacearum* avec les lignées A17 et F83005.5 montrent qu'elles sont respectivement résistante et sensible à la souche GMI1000. Une analyse génétique de lignées recombinantes à partir d'un croisement entre A17 et F83005.5 a mis en évidence un QTL majeur de résistance au flétrissement bactérien sur le chromosome 5 (Vailleau *et al.*, 2007).

La PAL est une enzyme de la voie des phénylpropanoïdes permettant à la synthèse d'une large variété de composés tels que la lignine, les coumarines, les phytoalexines antimicrobiennes et les flavanones (Dixon *et al.*, 2002). L'absence d'induction de la PAL chez A17 et F83005.5, mais une expression significative de PR5 chez A17 indique que cette dernière peut être induite sans la voie de l'acide salicylique.

Récemment une protéine de la famille PR-5 (ObTLP1) du basilic (*Ocimum basilicum*) a été fonctionnellement caractérisée et son expression dans les plantes transgéniques d'*Arabidopsis* a augmenté la tolérance aux infections par *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia sclerotiorum* (Misra *et al.*, 2016).

Par ailleurs, nous pensons que l'expression significative du gène PR5 par la lignée F83005.5 pourrait expliquer sa tolérance vis-à-vis de *A. rabiei* lequel mécanisme peut être renforcé par d'autres moyens de défense.

La surexpression des gènes codant pour des PR5 du riz stimule la résistance de cette plante à *Rhizoctonia solani* (Grover et Gowthaman, 2003) et de la carotte à une gamme d'agents pathogènes incluant *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia sclerotiorum* (Punja, 2005). Xu *et al.* (2003) ont détecté une expression simultanée de gènes de PR-1 et PR-5 dans des plants de tomates infectées par le Virus de la mosaïque du concombre.

L'induction de l'expression du gène PR-10 a été observé dans des feuilles de *M. truncatula* inoculées par *Colletotrichum trifolii* (Ameline-Torregrosa *et al.*, 2004). Selon Liu

et Ekramoudoullah (2006) *in* Benhamou (2009) les PR-10 ne jouent pas un rôle primordial car leur surexpression chez différentes plantes n'a pas entraîné une amplification de la résistance à l'infection. Nos résultats corroborent ces travaux puisque il n'y a pas eu d'induction de l'expression du gène PR-10 chez la lignée tolérante F83005.5 inoculée avec *A. rabiei*. En revanche, les travaux de Colditz et *al.* (2007) rapportent que des plantes de *Medicago truncatula* inoculées avec *Aphanomyces euteiches* montrent une tolérance accrue vis-à-vis de ce pathogène se traduisant au niveau du protéome des racines de l'hôte par une augmentation des niveaux d'induction de PR-5b et une réduction des niveaux de PR-10, tandis qu'une sensibilité accrue est notée suite à l'induction exclusive de protéines PR-10. Selon Benhamou (2009), les PR-10 ont un profil d'expression complexe et exercent des activités différentes en fonction des plantes.

Le gène CHIT pourrait constituer une partie des mécanismes de défense de la plante contre le parasite. Même si la colonisation des tissus par *A. rabiei* n'a pas été complètement stoppée chez F83005.5. Selon Benhamou (2009), l'expression constitutive des gènes codant pour les chitinases augmente avec l'âge et, le plus souvent, la concentration enzymatique est plus élevée dans les feuilles âgées que dans les feuilles jeunes. L'induction d'un gène de CHIT est aussi rapportée pour les racines inoculées avec *Phymatotrichopsis omnivora* (Uppalapati et *al.*, 2009) et les racines de F83005.5 inoculées avec *Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis* (Ramirez-Suero, 2009).

Enfin Ramirez-Suero (2009), réalisant une étude sur l'expression de gènes de défense dans les racines de *M. truncatula* inoculées avec *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*, n'observe pas de changement significatif dans le niveau d'expression du gène Pi20 chez A17 mais celui-ci est réprimé fortement chez F83005.5 à 6 dpi, avec un facteur de répression de 12 fois.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Le présent travail avait pour objectif la caractérisation de quelques isolats de *Ascochyta rabiei* dans la région du nord-ouest de l'Algérie. Les principaux résultats montrent une grande variabilité parmi les isolats étudiés sur les caractéristiques morphologiques culturales et pathogéniques.

La comparaison des isolats algériens par rapport à ceux observés dans les pays où l'anthracnose est anciennement signalée, montre que nos isolats sont aussi agressifs. Nos résultats relatifs à l'ouest algérien indiquent l'existence d'un pathotype hautement agressif (pathotype III) dans la région de Mascara et de Mostaganem.

L'étude moléculaire, grâce aux microsatellites, montre un faible polymorphisme parmi les isolats étudiés. La technique des microsatellites est plus simple et plus fiable pour identifier les différents pathotypes de *A. rabiei*, afin de mieux comprendre la structure génétique des populations algériennes de *A. rabiei*, en vue de suivre l'évolution des populations du pathogène vers des groupes plus virulents, dans le temps et dans l'espace. D'autres marqueurs sont nécessaires pour différencier les pathotypes III et IV, les plus agressifs connus actuellement, afin de mettre en place des stratégies de lutte génétique.

L'apparition de deux types de compatibilité sexuée (MAT-1-1 et MAT-1-2) dans l'ouest algérien suggère que la reproduction sexuée peut avoir lieu sur les résidus des cultures et que le téléomorphe peut constituer une autre source d'inoculum.

Par ailleurs *Medicago truncatula* semble être une plante intéressante pour la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les réactions de défense vis-à-vis de *Ascochyta rabiei*.

Cette étude menée avec un nombre limité de gènes montre des différences dans les réactions de défense des lignées de *M. truncatula* (A17 et F83005.5) pendant la confrontation avec *Ascochyta rabiei*.

La PR5 peut constituer un bon marqueur de résistance chez *Medicago truncatula*.

L'utilisation de la plante modèle *M. truncatula* peut aider à comprendre certains mécanismes de résistance et permettre l'extrapolation des connaissances acquises chez *M. truncatula* sur le pois chiche. Les résultats acquis sur cette plante seront d'autant plus intéressants que la transformation génétique de la plante de pois chiche est possible.

Le test d'inoculation par *A. rabiei* de feuilles détachées de *M. truncatula*, plus facile à contrôler, peut être utilisé pour étudier les mécanismes de défense, et peut être pour cribler des collections de lignées.

D'autres études pourront être effectuées dans l'avenir pour identifier des gènes impliqués dans les mécanismes de défense.

Dans l'avenir une étude plus élargie, incluant le centre et l'Est du pays, fera ressortir la fréquence de chaque pathotype comme à connaître leur éventuelle résistance aux fongicides pour permettre la réussite de tout programme de lutte chimique.

Le nombre de marqueurs microsatellites utilisés étant limité, une étude avec une gamme plus importante est souhaitable. Aussi, l'étude génétique, avec une plus grande collection d'isolats de *Ascochyta rabiei*, doit être envisagée avec les techniques de RFLP et de RADP, etc.

Les recherches à venir doivent être axées sur une plus grande collection d'isolats en vue de dresser une carte de distribution des mating type, formes reproductives opposées capables de s'entrecroiser et donner lieu éventuellement à des pathotypes agressifs.

En attendant que les agriculteurs disposent de génotypes hautement résistants, le contrôle de l'antracnose du pois chiche doit être réalisé selon un concept de lutte intégrée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- AAC., 2004. Pois chiche: Situation et perspectives. Le Bulletin Bimensuel, 17(15), 4 p.
- Abbo S., Redden R.J., Yadav S.S., 2007. Utilization of wild relatives. In: Yadav S.S., Redden B., Chen W., Sharma B. (eds) Chickpea breeding and management. CAB International, Wallingford, pp 338-354.
- Abbo S., Shtienberg D., Lichtenzveig J., Lev-Yadun S., Gopher A., 2003. The chickpea, summer cropping, and a new model for pulse domestication in the ancient Near East. *Quart Rev Biol* 78: 435-438.
- Abdelguerfi-Laouar M., Zine F., Bouzid L., Laib M., Kadria, A., 2000. Caractérisation Préliminaire De Quelques Cultivars Locaux de «*Citer arietinum*» Collectes dans La Région de Tizi- Ouzou. *Recherche Agronomique* 7: 51-65.
- Abdelguerfi-Laouar, M., 1999. Autoecology of spontaneous legumes used for forage and-or grazing in Algeria. In Etienne M. (ed.). Dynamics and sustainability of Mediterranean pastoral systems Zaragoza: CIHEAM Cahiers Options Méditerranéennes 39:97-101. [en ligne] (page consulté le 14 décembre 2015) <http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=99600054>.
- Abdelguerfi A., Laouar M., Hamdi N., Bouzid H., Zidouni F., Laib M., Bouzid, L., Zine F., 2001a. Les légumineuses alimentaires en Algérie : situation, état des ressources phylogénétiques et cas du pois chiche à Béjaia. 3èmes journées Scientifiques de l'INRAA, Béjaia, 11-13.
- Agarwal A., Tripathi H. S., 1999. Biological and chemical control of botrytis gray mould of chickpea. *J Mycol Plant Pathol* 29: 52-56.
- Agarwal D.K., Kulshreshtha M., Bhalla K., Sarbhoy A. K., 2003. Peronospora ciceris-a new species on *Cicer arietinum*. *J Mycopathol Res* 41(1): 71-73.
- Agrios G.N., 1988. Plant pathology. Third Edition. San Diego, California: Academic Press, Inc. 803p.
- Agrios G.N., 1997. Plant Pathology, 4th ed. San Diego: Academic Press, 635 p.
- Agrios G.N., 2005. Plant Pathology. 5th ed. Amsterdam:Elsevier/Academic Press.
- Aist J.R., 1976. Papillae and related wound plugs of plant cells. *Annu Rev Phytopathol* 14:145–163.
- Akem C., 1999. Ascochyta blight of chickpea: Present status and future priorities. *Int. J. Pest Manag.* 45: 131-137.
- Alajaji S.A., El-Adawy T.A., 2006. Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. *J Food Composition Analysis* 19: 806 – 812.
- Alam S.S., Bilton J.N., Slawin A.M.Z., et al., 1989. Chickpea blight: production of the phytotoxins solanapyrones A and C by *Ascochyta rabiei*. *Phytochemistry* 28: 2627-2630.
- Ali H., Alam S.S, Iqbal N., 2013. Genetic and Pathogenic Variability of *Ascochyta rabiei* Isolates from Pakistan and Syria as Detected by Universal Rice Primers. *J Plant Pathol Microb* 4: 212. doi:10.4172/2157-7471.1000212.

- Ali H., Haq M.A., Shah T.M., Rahman M., Chen W., 2012 a. Validation of molecular markers for resistance among Pakistani chickpea germplasm to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Eur. J. Plant Pathol.* 132: 237-244.
- Ali Q., Waseem M., Ahsan A., Nadeem T., M.N., Farooq J., Anwar M., Ahmad W., 2011. Molecular markers and QTLs for *Ascochyta rabiei* resistance in chickpea. Disponible sur: www.scopemed.org/?mno=7485 [page consultée le 10/12/2016]. doi:10.5455/ijavms.20110521105002
- Ameline-Torregrosa C., Cazaux M., Danesh D. et al., 2008. Genetic dissection of resistance to anthracnose powdery mildew. *Medicago truncatula*. *Mol Plant-Microbe Interact* 21: 61-9.
- Ameline-Torregrosa, C., Cluzet S., Fournier J., Huguet T. et al., 2004. Cytological, genetic, and molecular analysis to characterize compatible and incompatible interactions between *Medicago truncatula* and *Colletotrichum trifolii*. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 909–920.
- Ameziane E. A., 1981. Modalité d'expression de la résistance d'un cultivar de pois chiche (*Cicer arietinum*) à *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. Thèse de docteur-ingénieur, E.N.S.A., Rennes, 41p.
- Ameziane E.A., 1985. L'antracnose du pois chiche. ICARDA. Amélioration des légumineuses alimentaires, synthèse des travaux du stage de formation, Rabat, 10-16 Fev., 55-59.
- Ancillo G., Witte B., Schmelzer E., Kombrink E., 1999. A distinct member of basic (class I) chitinase gene family in potato is specifically expressed in epidermal cells. *Plant Mol Biol* 39: 1137-1151.
- Angevain M., Bernard R., Bresson F., 1983. Méthode d'infection artificielle pour la sélection de la luzerne contre *Phoma medicaginis* Malbr. & Roum. *Agronomie, EDP Sciences*, 3(9):911-916. [En ligne], (page consultée le 07 février 2017). Disponible sur : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00884589/document>.
- Anonyme, 1988. Le pois chiche et la lentille. Ed. ITGC, Alger, 45p.
- Armstrong C.L., Chong G., Gossen B.D., 2001. Mating type distribution and incidence of the teleomorph of *Ascochyta rabiei* (*Didymella rabiei*) in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23(1): 110-113.
- Armstrong-Cho C., Gossen B.D., Chongo G., 2004. Impact of continuous or interrupted leaf wetness on infection of chickpea by *Ascochyta rabiei*. *Can J Plant Pathol* 26:134–141.
- Atik O., Baum M., El-Ahmed A. et al., 2011. Chickpea *Ascochyta* blight: Disease status and pathogen mating type distribution in Syria. *J. Phytopathol* 159: 443–449.
- Atik O., Seid A., Abang M.M., Imtiaz M. et al., 2013. Pathogenic and genetic diversity of *Didymella rabiei* affecting chickpea in Syria. *Crop Protection* 46: 70–79.
- Attanayake K.P.R.N., Glawe D. A., McPhee K. E., Dugan, F. M., Chen, W., 2008. First Report of Powdery Mildew of Chickpea (*Cicer arietinum*) Caused by *Leveillula taurica* in Washington State. [en ligne] *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2008-0702-01-BR.
- Aujla S.S., 1964. Study on eleven isolates of *Phyllosticta rabiei* Pass. Trot., the causal agent of gram blight in the Punjab. *Indian Phytopathol* 17: 83-87.

- Ayad D., Sayoud R, Benbelkacem K. Bouznad Z., 2014. La tache septorienne du blé: Première signalisation de la présence en Algérie des deux Mating types du téléomorphe *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schröter, (anamorphe: *Septoria tritici* Rob. Ex Desm.) et diversité phénotypique de l'agent pathogène. *Nature et Technologie* 11:34-45.
- Baaziz M., Qacif N., Bendiab K., Aouad A., 2006. Les Peroxydases des plantes. Aspect théorique et Applications pratiques. Deuxième Congrès International de Biochimie. Agadir, Maroc, 9-12 Mai 2006, p 4-9.
- Bahr L., Castelli M.V., Barolo M.I., Mostacero N.R., Tosello M.E., Lopez S.N., 2016. Ascochyta blight: isolation, characterization, and development of a rapid method to detect inhibitors Q13 of the chickpea fungal pathogen *Ascochyta rabiei*. *Fungal Biology* 1-9.
- Bai J.Y., Wang D.Y., Li, H.J., Wang X.M., 2011. First report of *Ascochyta rabiei* causing ascochyta blight of *Cicer arietinum* in china. *Journal of Plant Pathology* [en ligne], 93. (page consultée le 25/06/2016). <http://file:///C:/Users/hp/Downloads/2401-1644-2-PB.pdf>.
- Barker D., Bianchi S., Blondon F., Dattée Y., Duc G., Essad S., et al. (1990). *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Mol Biol Report* 8 :40–49.
- Barnett H.L., Barry B. Hunter, 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. St. Paul, MN APS Press. 218 pp.
- Barve M.P., Arie T., Salimath S.S. et al., 2003. Cloning and characterization of the mating type (MAT) locus from *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) and a MAT phylogeny of legumes-associated *Ascochyta* spp. *Fungal Genetics and Biology* 39: 151-167.
- Basandrai A.K., Pande S., Krishna Kishore G., Crouch J.H., Basandrai, D., 2005. Cultural Morphological and Pathological Variation in Indian Isolates of *Ascochyta rabiei*, the Chickpea Blight Pathogen. *Plant Pathol Journal* 21(3): 207-213.
- Bayaa B., Chen W., 2011. Ascochyta blight of chickpea. In: *Chen W, Sharma HC, Muehlbauer FJ, eds. Compendium of Chickpea and Lentil Diseases and Pests.* p. 34-40.
- Bayraktar H., Dolar F.S., Tor M., 2007. Determination of genetic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., the cause of ascochyta blight of chickpea in turkey. *J Plant Pathol* 89(3): 341-347.
- Bedi P.S., Aujla S.S., 1970. Factors affecting the mycelial growth and size of pycnidia produced by *Phyllosticta rabiei* (Pass.) Trot., the incitant of gram blight. *J. Res. Punjab Agric. Univ.* 4:606-609.
- Bejiga G., Vander maesen L.J.G., 2006. *Cicer arietinum* L. In Brink, M. & Belay, G. Ressources végétales de l'Afrique tropicale (PROTA) 1: cereals and pulses/cereals et legumes secs. PROTA, Wageningen, Pays bas, 46-51.
- Belabid L., Fortas Z., 2011. La fusariose vasculaire de la lentille dans le nord-ouest Algérien. Morphologie, pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* (Schlecht) Emend. S. et H. f. sp. *lentis* (Vasud. et Srini.). Ed. Universitaires européennes, Allemagne, 159 p.

- Ben C., Toueni M., Montanari S., et al., 2012. Natural diversity in the model legume *Medicago truncatula* allows identifying distinct genetic mechanisms conferring partial resistance to *Verticillium* wilt. *J. Exp Bot.* doi: 10.1093/jxb/ers337.
- Benfreha F.Z., Henni D.E., Merzoug A., 2014. Fusarium wilt of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) in northwest Algeria. *African J Agric Res* 9(1): 168-175.
- Benhamou N., 2009. La résistance chez les plantes. Principes de stratégie défensive et applications agronomiques. Editions TEC & DOC, Lavoisier, Paris. 376 p.
- Benhamou N., Lafontaine P.J., Nicole M., 1994. Seed treatment with chitosan induces systemic resistance to Fusarium crown and root rot in tomato plants. *Phytopathology* 84: 1432-1444.
- Benhamou N., Lafontaine P.J., 1995. Ultrastructural and cytochemical characterization of elicitor-induced responses in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Planta*, 197:89-102.
- Benmbarek K., 2011. Comportement du pois chiche (*Cicer arietinum*) du type « Kabuli » vis-à-vis du stress hydrique et identification des génotypes tolérants la sécheresse; Th. Doct., institut supérieur agronomique de Chott Meriem –Tunisie.
- Bent A.F., MacKey D., 2007. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and life time supply of questions. *Annu Rev Phytopathol* 45:399-436.
- Benzohra I.E., Bendahmane B.S., Youcef Benkada M., Labdi M., 2015. Screening of 15 Chickpea Germplasm Accessions for Resistance to *Ascochyta rabiei* in North West of Algeria. *American-Eurasian J Agric Environ Sci* 15(1): 109-114.
- Besancon, 2009. Crdp2.ac-besancon.fr/.../medicago_truncatula.htm.
- Berger J.D., 2014. An evolutionary perspective on the role of phenology in the specific adaptation of chickpea. *Legumes Perspectives* (3):8-11.
- Bessire M., Chassot C., Jacquat A.C., et al., 2007. A permeable cuticle in Arabidopsis leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *Embo Journal* 26:2158-2168.
- Bhargava P. K., 1995. Impact of seed transmission of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler on seed quality and yield of Chickpea. *Indian Phytopathol* 48 (3): 285-288.
- Bhargava P. K., Khare M.N., 1988. Epidemiology of alternaria blight of chickpea. *Indian Phytopathol* 41:195-198.
- Bhatti M.A., Khan S.M., Ajmal A.H., 1983. *Verticillium albo-atrum* causing wilt of chickpea. *Pak J Agr Res* 4(4): 260-262.
- Bistolfi R., Mardam-Bey F., 1998. Traité de pois chiche. Erles France : Actes du Sud. 226p.
- Bistolfi R., Mardam-Bey F., 1991. Le pois chiche. Ed. Arles: Actes Sud, 90p.
- Blondon F., Marie D., Brown S., Kondorosi A., 1994. Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome* 37: 264-270.

- Bonin I., Huguet T., Gherardi M., Prosperi J., Olivieri I., 1996. High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species, *Medicago truncatula* (Leguminosae), shown using RAPD markers. *Americ. J Bot* 83:843–855.
- Boughrarou F., 1992. Contribution à l'étude de génotypes algériens de *Cicer arietinum* L. en vue de leur amélioration. Thèse de magister INA, 141p.
- Boulenouar, N., Marouf, A., Cheriti, A. (2011). Phytopathologie fongique et métabolites secondaires. *Annales de l'université de Bechar* 11 :32-39.
- Bouzerzour H., Abbas K., Benmahammed A., 2003. Les céréales, les légumineuses alimentaires, les plantes fourragères et Pastorales. Recueil des communications, Atelier N°3 « Biodiversité importante pour l'Agriculture » MATE-GEF/PNUD Projet ALG/97/G31, pp 79.
- Bouznad Z., 1991. Recherche sur la variation pathologique de *Ascochyta rabiei*, agent de l'antracnose du pois chiche et de la résistance du matériel végétal introduit en Algérie. Réunion de coordination projet de Maghreb/ICARDA, Tunis, 8-12 Octobre 1991.
- 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. Thèse de doctorat d'état, Université P. et M. Curie, Paris, 217p.
- Bouznad Z., Maatougui M.E.H., Labdi M., 1996. Importance et distribution géographique des maladies fongiques des légumineuses alimentaires en Algérie. In :*Regional symposium on cereals and legumes diseases*. INRA, Rabat, Maroc, 11-14 nov.1996, pp. 13-19.
- Broekaert W.F., Van Parijs J., Allen A.K., Peumans W.J., 1988. Comparison of some molecular, enzymatic and antifungal properties of chitinases from thorn-apple, tobacco and wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 33: 319-331.
- Campbell B.C, Chan K.L., Kim J.H., 2012. Chemosensitization as a means to augment commercial antifungal agents. *Frontiers in Microbiology* 3: 1-20.
- Chabaud M., de Carvalho Niebel F., Barker D.G., 2003. Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Rep* 22: 46-51.
- Chabaud M., Larssonneau C., Marmouget C., Huguet T., 1996. Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the MtENOD12 nodulin promoter fused to the gus reporter gene. *Plant Cell Rep* 15(5): 305-310.
- Champion R., 1997. Identifier les champignons transmis par les semences. Techniques et Pratiques. Paris, FRA : INRA Editions, 398 p.
- Chaux C., Fourry C., 1994. Production légumières secs, Tome 3, Légumineuses fourragères, Légumes fruits. Technique et Documentation. Lavoisier Paris, pp 3-15.

- Chen W., Coyne C.J., Peever T.L., Muehlbauer F.J., 2004. Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of ascochyta blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*. *Plant Pathol* 53: 759-769.
- Chen, Y.M., Strange, R.N. (1994). Production of a proteinacious phytotoxin by *Ascochyta rabiei* grown in expressed chickpea sap. *Plant Pathol.* 43: 321-327.
- Chen W., Schatz B., Henson B. et al., 2006. First Report of Sclerotinia Stem Rot of Chickpea Caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in North Dakota and Washington, *Plant disease* [en ligne] 90 (1): 114(page consultée le 15 mars 2016) <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-0114A>.
- Chettou A., Sbaghi M., Msetef Y., 2005. Résistance partielle et interaction hôte- pathogène dans l'association *Ascochyta rabiei* - *Cicer arietinum*. *AL Awamia* 114(2): 2.
- Chérif M., Arfaoui A., Rhaïem A., 2007. Phenolic compounds and their role in biocontrol and resistance of chickpea to fungal pathogenic attacks. *Tunisian J Plant Protection* (2): 7-21.
- Choi H.K., Kim D., Uhm T., Limpens E et al., 2004a. A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics* 166: 1463–1502.
- Chongo G., Buchwaldt L., Gossen B.D. et al., 2003. Foliar fungicides to manage ascochyta blight [*Ascochyta rabiei*] of chickpea in Canada. *Can. J. Plant Pathol* 25 (2): 135–142.
- Chongo G., Gossen B.D., Buchwaldt L., Adhikari T., Rimmer S.R., 2004. Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. *Plant Disease* 88: 4-10.
- Colditz F., Braun H.P., 2010. *Medicago truncatula* proteomics. *J Proteomics* 73:1974–1985.
- Colditz F., Niehaus K., Krajinski F., 2007. Silencing of PR-10-like Proteins in *Medicago Truncatula* Results in an Antagonistic Induction of Other PR Proteins and in an Increased Tolerance Upon Infection With the Oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Planta* 226 (1): 57-71.
- Collard B.C.Y., Ades P.K., Pang E.C.K., Brouwer J.B., Taylor P.W.J., 2001. Prospecting for sources of resistance to ascochyta blight in wild *Cicer* species. *Australasian Plant Pathol* 30: 271–276.
- Corbaz R., 1956. Recherches sur le genre *Didymella* Sacc. *Phytopathol* 28: 375-414.
- Corbaz R. 1956. Recherches sur le genre *Didymella* Sacc. Thèse présentée à l'Ecole Polytechnique Fédérale, Zurich, pour l'obtention du grade de Docteur des Sciences naturelles, 415p.
- Corbaz, R., 1990. Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. PPUR presses polytechniques, 286 p.
- Covelle S., Ellis R.H., Roberts E.H., Summerfield R.J., 1986. The influence of temperature on seed germination rate in grain legumes. A comparison of chickpea, lentil, soybean and cowpea at constant temperatures. *J Exp Botanic* 37.(5): 705-715.
- Crawford E.J., Lake A.W.H., Boyce K.G., 1989. Breeding Annual *Medicago* species for semiarid conditions in southern Australia. *Advances in Agronomy* 42: 399-437.
- Crujeiras A.B, Parra D., Abete I. et al., 2007. A hypocaloric diet enriched in legumes specifically mitigates lipid peroxidation in obese subjects. *Free Radical Research* 41: 498-506.

- Cubero J.I., 1987. Morphology of chickpea. In "The Chickpea", Ed. Saxena M.C. & Singh K.B., ICARDA, 35-66.
- Cubero J.I., 1984. Genetic resources and their exploitation-chickpea, faba bean and lentils, pp 131-144 (Eds J.R. Witcomb and W. Erskine) Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands.
- Dalhouni D., Harrabi M.M., Rezgui S., BelHadj O., 1999. Caractérisation biochimique des espèces annuelles, cultivées et sauvages, du pois chiche (*Cicer arietinum* L.). 6èmes Journées Nationales sur les Résultats de la Recherche Agronomique ; Nabeul, 6 et 7 Décembre 1999.
- Davis P.H., 1969. Material for a flora of Turkey, XIX -Leguminosae-Viciae, *Notes Roy Bot Gard.* Ed., 29:312-313.
- Dixon R.A., 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847.
- Dixon R.A., Achnine L., Kota P., Liu C., Reddy M.S.S., Wang L., 2002. The phenylpropanoid pathway plant defence— a genomics perspective. *Mol Plant Pathol* 3: 371-390.
- Djaoui A., 1985. Etude de l'anthracnose du Pois chiche : pouvoir pathogène et comportement varietal vis-à-vis de quelques souches de *Ascochyta rabiei*. Mémoire d'ingénieur Agronome, Alger, 53 p.
- Djebali N., 2008. Etude des mécanismes de résistance de la plante modèle *Medicago truncatula* vis-à-vis de deux agents pathogènes majeurs des légumineuses cultivées : *Phoma medicaginis* et *Aphanomyces euteiches*. Thèse doctorat. Université Toulouse, 209 p.
- Djebali N., 2013. Aggressiveness and host range of *Phoma medicaginis* isolated from *Medicago* species growing in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea* 52(1) : 3–15
- Djebali N., Mhadhbi H., Jacquet C., Huguet T., Aouani M.E., 2007. Involvement of hydrogen peroxide, peroxidase and superoxide dismutase in response of *Medicago truncatula* lines differing in susceptibility to *Phoma medicaginis* infection. *J Phytopathol* 155: 633–640.
- Dolar F.S., Tenuta A., Higgins V.J., 1994. Detached leaf assay for screening chickpea for resistance to ascochyta blight. *Canadian J. Plant Pathol* 16:215-220.
- Dönmez A.A., 2011. *Cicer uludereensis* Dönmez: a new species of *Cicer* (Chickpea) (Fabaceae) from around the Fertile Crescent, SE Turkey. *Turkish Journal of Botany* [en ligne],35:71-76.(page consultée le 25 juillet 2016). <http://journals.tubitak.gov.tr/botany/issues/bot-11-35-1/bot-35-1-8-1001-283.pdf>.
- Doyle J.J., Luckow M.A., 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131: 900–910. (page consultée le 20/09/2016). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1540290/pdf/hw0900.pdf>.
- Dugan F.M., Lupien S.L., Hernandez-Bello M., Peever T.L., Chen W., 2005. Fungi Resident in Chickpea Debris and their Suppression of Growth and Reproduction of *Didymella rabiei* under Laboratory Conditions. *J Phytopathol* 153(7):431-439.
- Du W., Zhao X., Raju T., Davies P., Trethowan R., 2013. Studies on the resistance of some Australasian chickpeas (*Cicer arietinum* L.) to Phytophthora root rot disease. *Australian Journal of*

Références bibliographiques

- Crop Science 7(6):794-800. [En ligne], (page consultée le 05/03/2016) http://www.cropj.com/du_7_6_2013_794_800.pdf.
- Duke J.A., 1981. Handbook of legumes of world economic importance. Ed. Plenum press, New-York and London, 345 pp.
- Ebrahim S., Usha K., Singh B., 2011. Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. [En ligne], (page consultée le 20/12/2016) <http://www.formatex.info/microbiology3/book/1043-1054.pdf>.
- Edwards O.R., Singh, K.B. (2006). Resistance to insect pests; what do legumes have to offer? *Euphytica* 147: 273-285.
- Ellwood S., Lichtenzveig J., Pfaff T. et al. 2005b. Resistance to fungal necrotrophs in *Medicago truncatula*. Model Legume Congress, pp. 100.
- Ellwood S.R., Kamphuis L.G., Olivier R.P., 2006. Identification of sources of resistance to *Phoma medicaginis* isolates in *Medicago truncatula* SARDI core collection accessions, and multigene differentiation of isolates. *Phytopathology* 96, 1330–1336.
- Ellwood S.R., Parker K., Oliver R.P., 2001. Disease resistance diversity to fungal necrotrophs in *Medicago truncatula*. 4th workshop on *Medicago truncatula*.
- Fabre C., 2008. Pois chiche. Fiche Technique Production Développée en Languedoc-Roussillon. [En ligne], http://www.gard.chambagri.fr/fileadmin/Pub/CA30/Internet_CA30/Documents_Internet_CA30/Diversification_Fiches/Fiche_Pois_Chiche.pdf.
- FAO, 2015. Statistical database of the Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO, 2016. [En ligne], <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC>.
- Filipenko E.A., Kochetov A.V. et al., 2013. PR-Proteins with ribonuclease activity and plant resistance against pathogenic fungi. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* 3(6):474-480.
- Frugoli J., Harris J., 2001. *Medicago truncatula* on the move! *Plant Cell* 13: 458-63.
- Gajera H.P., Disha D. Savaliya Patel S.V., Golakiya B.A., 2015. *Trichoderma viride* induces pathogenesis related defense response against rot pathogen infection in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Infection, Genetics and Evolution* 34: 314–325.
- Galloway J., MacLeod W.J., 2003. *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, found in chickpea stubble in Western Australia. *Austr Plant Pathol* 32: 127- 128.
- Gamas P, De Carvalho-Niebel F, Lescure N, Cullimore J., 1996. Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Plant Micr Interact* 9: 233–242.
- Ganeshamoorthi P., Dubey S.C., 2015. Morphological and pathogenic variability of *R. solani* isolates associated with wet root rot of chickpea in India. *Legume Research* 38 (3):389-395.

- Gaur, P.M., A.K. Jukanti, R.K. Varshney. (2012). Impact of genomic technologies on chickpea breeding strategies. *Agron. J.* 2:199–221. doi:10.3390/agronomy2030199.
- Gaur P.M., Tripathi S., Gowda C.L.L., et al. 2010. Chickpea Seed Production Manual. Patancheru, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 28 pp.
- Geistlinger J., Weising K., Winter P., Kahl G., 2000. Locus-specific microsatellite markers for the fungal chickpea pathogen *Didymella rabiei* (anamorph) *Ascochyta rabiei*. *Mol Ecol* 9: 1939–1941.
- Gharbi S., Karkachi N., Kihal M., Henni J. E., 2013. Carbon sources and pH effect on pectinolytic activity production by *Ascochyta rabiei* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) in West Algeria. *African Journal of Microbiology Research* 7(27): 3483-3488.
- Gharbi S., Karkachi N., Chhiba M., Kihal M., Henni D.E., 2015. Comparison of *Ascochyta rabiei* isolates for cultural characteristics and isozyme. [en ligne], <http://www.innspub.net/wp-content/uploads/2015/03/IJB-V6No4-p30-39.pdf> *International Journal of Biosciences* 6(4): 30-39.
- Ghosh R., Sharma M., Telangre R., Pande S., 2013. Occurrence and Distribution of Chickpea Diseases in Central and Southern Parts of India. *American Journal of Plant Sciences* 4: 940-944.
- Gil J., Nadal S., Luna D., Moreno M.T., De Haro A., 1996. Variability of some physico-chemical characters in Desi and Kabuli chickpea types. *J. Sci. Food Agric.* 71: 179-184.
- Girard C., 1985. Installation du pois chiche de printemps. In: Bulletin FNAMS semences 25-27.
- Gorlenko M.V., Bushkova L.N., 1958. Perfect state of the causal agent of aschochytois of chickpea. *Rev App Mycol* 37: 695.
- Grewal J.S., 1984. Evidence of physiologic races in *Ascochyta rabiei* of chickpea. In M.C. Saxena & K.B. Singh (eds.). Proceedings of the Workshop on *Ascochyta* Blight and Winter Sowing of Chickpeas, ICARDA, Aleppo, Syria, 55-65.
- Grover A., Gowthaman R., 2003. Root defense responses to fungal pathogens: a molecular perspective. *Current Science* 274: 215-226.
- Guillon F., Champ M.M., 2002. Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *Br J Nutr* 88, Suppl. 3, 293-306.
- Guzman P., Davis R.M., Gilbertson R.L., Smith S.N., Temple S., 1995. First report of *Ascochyta rabiei* causing *Ascochyta* blight of garbanzo in California. *Plant Dis* 79: 82.
- Haafiz A., Achraf, M. (1953). Studies on the inheritance of resistance to *Mycosphaerella* blight in gram. *Phytopathology* 43: 580-581.
- Haas D., Blumer C., Keel C., 2000. Biocontrol ability of fluorescent pseudomonads genetically dissected: importance of positive feedback regulation. *Current Opinions Biotechnol* 11: 290–297.
- Halila H., Harrabi M., Haddad A., 1989. Genetics of resistance to *Ascochyta* and wilt diseases. *Option mediterr.* Serie seminaries, 9: 163-166.
- Harborne J.B., 1999. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology* 27:335-367.

- Harijati N., Keane P.J., 2012. Disease Development Caused by *Ascochyta rabiei* on Chickpea Detached-Leaves in Petri Dishes. *American Journal of Plant Sciences* 3:1369-1375. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2012.310165>.
- Haware MP., Faris D.G., Gowda C.L.L. 1992. Botrytis gray mold of chickpea: summary proceedings of the BARI/ICRISAT Working Group Meeting to Discuss Collaborative Research on Botrytis Gray Mold of Chickpea, 4-8 Mar 1991. Iovdebpur, Bangladesh. Patancheru, A.P. 502 324. India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 23 pp.
- Haware M.P., Nene Y.L., 1981. Phoma blight: A new disease of chickpea. *Plant Disease* 65:282-282.
- Haware P.M., Nene Y.L., Mathur S.B., 1986. Seed borne diseases of chickpea. *Technical Bulletin of the Institute of Seed Pathology for Developing Countries* 1:8-15.
- Hamwiah, A., Imtiaz, M., Hobson, K., Ahmed Kemal, S. (2013). Genetic diversity of microsatellite alleles located at quantitative resistance loci for *Ascochyta* blight resistance in a global collection of chickpea germplasm. *Phytopathologia Mediterranea* 52(1): 183–191.
- Höhl B.M., Pfautsch M., Barz W., 1990. Histology of disease development of resistant and susceptible cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L) inoculated with spores of *Ascochyta rabiei*. *J. Phytopathol* 129: 31–45.
- Höhl B., Weidemann C., Höhl U., Barz W., 1991. Isolation of solanapyrones A, B and C from culture filtrates and germination fluids of *Ascochyta rabiei* and aspects of phytotoxin action. *J. Phytopathol* 132: 193–206.
- Hosen M.I., Ahmed A.U., Islam M. R., 2010. Physiological variability and in vitro antifungal activity against *Botrytis cinerea* causing botrytis gray mold of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Spanish J Agric Res* [En ligne] 8(3), 750-756. (page consultée le 20/01/2017) www.inia.es/sjar.
- Houasli C., Nasserlhaq N., Elbouhmadi K., Mahboub S., Sripada U., 2014. Effet du stress hydrique sur les critères physiologiques et biochimiques chez neuf génotypes de pois chiche (*Cicer arietinum* L.). *Nature and Technology* [en ligne], N°11, 16-18p. (page consultée le 3 décembre 2016). http://www.univ-chlef.dz/revuenatec/Issue_11_Art_244_B_02.pdf.
- Hückelhoven R., 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol* 45: 101-127.
- ICRISAT, 1990. Chickpea in The nineties proceeding of the 2nd International workshop on chickpea improvement, 4-8 dec 1989, ICRISAT Center, India, Patancheru, AP 502, 324, India.
- ICRISAT, 2008. Chickpea kabuli variety ICCV6. Plant material description. *Icrisat Bull*, 12.
- Ilarsan H., Dolar F.S., 2002. Histological and Ultrastructural Changes in Leaves and Stems of Resistant and Susceptible Chickpea Cultivars to *Ascochyta rabiei*. *J Phytopathol* 150(6): 340-348.
- Imtiaz M., Abang M.M, Malhotra R.S, et al., 2011. Pathotype IV, a new and highly virulent pathotype of *Didymella rabiei*, causing *Ascochyta* blight in chickpea in Syria. *Plant Disease* 95: 1192-1192.
- Intizar-ul-Hassan M., Ali S., Mohsan M., Idrees A., 2012. Evaluation of chickpea germplasm against collar rot disease caused by *Phytophthora megasperma*. *Mycopath* 10(1):13-15.

- Iqbal S.M., Ali S., Ghafoor A. 2010. Development of resistance in chickpea to *Ascochyta* blight. *Mycopath* 8(2):61-64.
- Iqbal S.M., Ghafoor A., Ayub N., Ahmad Z., 2004. Pathogenic diversity in *Ascochyta rabiei* isolates collected from Pakistan. *Pak J Botany* 36(2): 429-437.
- Jain S, Kumar A. 2015. The Pathogenesis Related Class 10 proteins in Plant Defense against Biotic and Abiotic Stresses. *Adv Plants Agric Res* 2(7): 00077.DOI:10.15406/apar.2015.02.00077.
- Jamil E.F., Sarwar N., Sarwar M., Khan J.A., Geistlinger J., Kahl G., 2000. Genetic and pathogenic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. populations in Pakistan causing blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiol Mol Plant Pathol* 57: 243-254.
- Jamil F. F., Sarwar M., Sarwar N., Khan J. A., Zaid, H. M., Yousaf S., Imran H. M., Haq I., 2010. Genotyping with RAPD markers resolves pathotype diversity in the *Ascochyta* blight and *Fusarium* wilt pathogens of chickpea in Pakistan. *Pak J Bot* 42(2): 1369-1378.
- Jan H., Wiese M.V., 1991. Virulence forms of *Ascochyta rabiei* affecting chickpea in the Palouse. *Plant Disease* 75: 904-906.
- Jayakumar P., Gan Y.T., Gossen B.D., Warkentin T.D., Banniza S., 2005. *Ascochyta* blight of chickpea: infection and host resistance mechanisms. *Canadian Plant Pathol* 27(4): 499-509.
- Jimenez-Díaz R.M., Castillo P., Jimenez-Gasco M.M., Landa B.B., Navas-Cortes J.A., 2015. *Fusarium* wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop Protection* [En ligne],(consultée le 20/01/2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.023>.
- Jose D., Jayesh P., Gopinath, P., Mohandas A., Bright, Singh I.S., 2014. Potential application of β -1, 3 glucanase from an environmental isolate of *Pseudomonas aeruginosa* MCCB 123 in fungal DNA extraction. *Indian J Exp Biol* 52: 89-96.
- Journet E.P., El-Gachtouli N., Vernoud V. et al., 2001. *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early noduling gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant Microbe Interact.* [en ligne],14(6):737-48. (page consultée le 27/12/2015). <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/MPMI.2001.14.6.737>.
- Jukanti A. K., Gaur P. M., Gowda C.L.L., Chibbar R.N., 2012. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *British J Nutrition* 108: 11-26.
- Kaiser W.J., 1972. Occurrence of three fungal diseases of chickpea (*Cicer arietinum*) in Iran. *FAO Plant Protect Bull* 20: 73-8.
- Kaiser W.J., 1973. Factors affecting growth, sporulation, pathogenicity and survival of *Ascochyta rabiei*. *Mycologia* 65: 444-457.
- Kaiser W.J., 1981. Diseases of chickpea, lentil, pigeon pea and tepary bean in continental United states and Puerto Rico. *Economic Botany* [en ligne], 35 (3): 300-320. (Consulté le 20 juin 2016). <https://www.ndsu.edu/pubweb/pulse-info/resources-pdf>.
- Kaiser W., 1997a. Inter- and intranational spread of *ascochyta* pathogens of chickpea, faba bean, and lentil. *Can J Plant Pathol* 19: 215-224.

- Kaiser W.J., 1997b. The teleomorph of *Ascochyta rabiei* and its significance in breeding chickpea. In: Application of DNA Fingerprinting for Crop Improvement: Marker-Assisted Selection of Chickpea for Sustainable Agriculture in the Dry Areas (Eds Udupa SM, Weigand F), pp. 3–21. ICARDA, Aleppo, Syria.
- Kaiser, W.J., Hannan, R.M., 1983. Etiology and control of seed decay and preemergence damping-off chickpea by *Pythium ultimum*. *Plant Disease* 67: 77-81.
- Kaiser W.J., Hannan R. M., 1987. First report of *Mycosphaerella rabiei* on chickpeas in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 71: 192.
- Kaiser J., Kusmenoglu I., 1997. Distribution of mating types and the teleomorph of of *Ascochyta rabiei* on Chickpea in Turkey [en ligne], 81(11). (page consultée le 25/11/2016) <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.1997.81.11.1284>.
- Kauffman S., Dorey S., Fritig B., 1999. Les stratégies de défense des plantes. *Pour la Science* 262: 30-37.
- Kaur S., 1995. Phytotoxicity of solanapyrones produced by the fungus *Ascochyta rabiei* and their possible role in blight of chickpea (*Cicer arietinum*). *Plant Science* 109: 23-29.
- Kaur L., Sandhu J.S., Malhotra R.S., Imtiaz M., Sirari A., 2012. Sources of stable resistance to ascochyta blight in exotic kabuli chickpea. *J Food Legumes* 25(1): 79-80.
- Khan H.R., McDonald G.K. Rengel Z., 1998a. Assessment of the Zn status of chickpea by plant analysis. *Plant Soil* 198:1-9.
- Khan M.S.A., Ramsey M.D., Scott E.S., 1999. Host range studies with an Australian isolate of *Ascochyta rabiei*. *Australian Plant Pathology* 28: 170-173.
- Khan M.S.A., Ramsey M.D., Corbière R. et al. 1999b. *Ascochyta* blight of chickpea in Australia: identification, pathogenicity and mating type. *Plant Pathology* 48: 230-234.
- Khanna-Chopra R., Sinha S.K., 1987. Chickpea: physiological aspects of growth and yield. In: The chickpeas. M.C. Saxena and K.B. Singh eds. CAB International, U.K. pp. 163-189.
- Khouader M., Benkirane R., Touhami A.T., Douira A., 2013. Étude de quelques Pucciniales liés aux plantes cultivées au Maroc. *Journal of Applied Biosciences* 72: 5869–5882.
- Kim W., Park C.M, Park J.J., Akamatsu H.O. et al. (2015). Functional Analyses of the Diels-Alderase Gene *Sol5* of *Ascochyta rabiei* and *Alternaria solani* Indicate that the Solanapyrone Phytotoxins Are not required for Pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, [en ligne] 28(4): 482-496. Page consultée le 14/07/2016) <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-08-14-0234-R>.
- Köhler G., Linkert C., W. Barz., 1995. Infection Studies of *Cicer arietinum* (L.) with GUS-(*E. coli* β -glucuronidase) Transformed *Ascochyta rabiei* Strains. 143(10): 589-59.
- Kovachevski I. C., 1936. The blight of chickpea (*Cicer arietinum*), *Mycosphaerella rabiei*. Ministry of Agriculture and National Domains, Plant Protection Institute, Sofia, Bulgaria.
- Labdi M., 1995. Etude de la résistance à l'anthracnose (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.) chez le pois chiche (*Cicer arietinum* L.). Thèse de Doctorat de l'ENSA Montpellier, 155p.

Références bibliographiques

- Labdi M., 1990. Contribution à l'étude de la variabilité d'isolats d'*ascochyta rabiei*, agent de l'anthracnose du pois chiche en Algérie. Mémoire pour l'obtention de diplôme d'agronomie Approfondie. ENSA de Montpellier. 36 p.
- Labdi M., Belabid A., Bekki H., Irekti, H., Ouzzane A.H., 2009a. Situation des légumineuses alimentaires en Algérie et à l'Ouest du pays. Actes de l'Atelier Régional sur la Recherche Scientifique et le développement de l'Agriculture. Mostaganem. 12-13 janvier 2009.
- Ladizinsky G., 1975. A new *Cicer* from Turkey. Notes of the Royal Botanic Garden Edinburgh 34: 201-202.
- Ladizinsky G., 1989. Pulse domestication: Fact and Fiction. *Econ. Bot* 43: 131-133.
- Ladizinsky G., Abbo S., 2015. The Search for Wild Relatives of Cool Season Legumes. *Plant Science*, DOI 10.1007/978-3-319-14505-1_2.
- Ladizinsky G., Alder A., 1976a. Genetic relationships among annual species of *Cicer* L. *Theor Appl. Genet* 48 (4):197-203.
- Larrainzar E., Wienkoop S., Weckwerth W., Ladrera R., Arrese-Igor C., Gonzalez E.M., 2007. *Medicago truncatula* Root Nodule Proteome Analysis Reveals Differential Plant and Bacteroid Responses to Drought Stress. *Plant Physiol* 144: 1495-507.
- Latif Z., Strange R.N., Bilton J., Riazuddin S., 1993. Production of the phytotoxins, solanapyrones A, and C and cytochalasin D among nine isolates of *Ascochyta rabiei*. *Plant Pathol* 42: 172-180.
- Lapeyronie A., 1982. Les productions fourragères méditerranéennes. Tome I : Généralités, caractères botaniques et biologiques. Techniques agricoles et productions méditerranéennes. Ed. G.P. Maisonneuve & Larose, Paris, France.
- Lawrence C.B., Singh N.P., Qiu J., Gardner R.G., Tuzun S., 2000. Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism. *Physiol Mol plant pathol* 48: 361-377.
- Lebel S., Shhellenbaum P., Walter B., Maillot P., 2010. Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10 multigene family. *BMC Plant Biology*. Consulté le 10/08/2010. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00591990/document>. doi: 10.1186/1471-2229-10-184.
- Legrand M, Kauffmann S., Geoffroy P., Fritig B., 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis related proteins are chitinases. *Proceeding of National Academy of Sciences* 84: 6750-6754.
- Lepoivre P., 2003. Phytopathologie. De Boeck, Bruxelles, 427 pp.
- Leport L., Turner N.C., Davies S. L., Siddique K.H.M., 2006. Variation in pod production and abortion among chickpea cultivars under terminal drought. *Europ J Agron* 24: 236- 246.
- Lesins K. , Lesins I., 1979. Genus *Medicago* (Leguminosae), A Taxogenetic Study. Dr. W. Junk, The Hague, Boston, London, 228 pp.
- Lie T.A, 1971. Temperature dependent root nodule formation in pea cv. Iran. *Plant soil* 34: 751-752.

- Livak Kenneth J., Schmittgen Thomas D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408. (Page consultée le 05 janvier 2016). <http://www.gene-quantification.net/livak-2001.pdf>.
- López-Bellido L., López-Bellido R.J., Castillo J.E., López-Bellido F.J., 2004. Chickpea response to tillage and soil residual nitrogen in a continuous rotation with wheat: I. Biomass and seed yield. *Field Crop Res* 88: 191-200.
- Lopez-Fernandez O., Rial-Otero R., Gonzalez-Barreiro C., Simal-Gandara J., 2012. Surveillance of fungicidal dithiocarbamate residues in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 134: 366-374.
- Luthra J.C., Sittar A., Bedi K.S., 1935. Life-history of gram blight [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. *Phyllosticta rabiei* (Pass.) Trot.] on gram (*Cicer arietinum* L.) and its control in the Punjab. *Agriculture and Livestock in India*, 5: 489–98.
- Mabsoute L., Meskine M., Bouznad Z., Kharrat M., 1996. Résultats des surveillances sur les maladies cryptogamiques des principales légumineuses alimentaires dans le Maghreb. PP : 43-50. In : *Proceeding du symposium Régional sur les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires*. 11-14 nov. 1996, Rabat, Maroc Projet Maghrébin PNUD/RAB/91/007.
- Madrid E., Bouhadida M., Dolar S. , Kharrat M. , Houasli C., Rubio J., 2015. Chickpea production in Mediterranean Basin. *Legume Perspectives* 10:5-7.
- Maitlo S.A., Syed R.N., Rustamani M.A., Khuhro R.D., Lodhi A.M., 2016. Influence of Inoculation Methods and Inoculum Levels on the Aggressiveness of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* on Chickpea and Plant Growth. *Int J Agric Biol* 18: 31–36.
- Melchers L.S., Groot M.A.D., Knapp J.A.V.D. et al., 1994. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays anti-fungal activity. *Plant Journal* 5: 469-480.
- Meynard J.M., Doré T., Lucas P., 2003. Agronomic approach: cropping systems and plant diseases. *C. R. Biologies* 326 (1): 37-46.
- Millán T., Madrid E., Cubero J.I., Amri M., Castro P., Rubio J., 2015. Chickpea. In: *Handbook of plant Breeding: Grain legume*. Ed. Antonio M. De Ron Misión Biológica de Galicia (MBG) Spanish National Research Council (CSIC) Ponteved, Spain. 437p.
- Misra, R.C., et al., 2016. A thaumatin-like protein of *Ocimum basilicum* confers tolerance to fungal pathogen and abiotic stress in transgenic Arabidopsis. *Sci Rep* 625340/10.1038/srep25340.
- Montorsi F., Di Giambattista G., Porta-Puglia A., 1992. First report of *Ascochyta rabiei* on berseem lover seeds. *Plant Disease* 76: 538.
- Moolani M.K., Chandra S., 1970. Gram cultivation in Haryana. Bulletin of the Haryana Agricultural University, Hisar India, 15pp.
- Moreau F., 1953. Les champignons. Encyclopédie Mycologique, Ed. Paul Lechevalier, Paris, 2120 p.

- Moreau D.; Salon, C., Munier-Jolan N., 2006. Using a standard framework for the phenotypic analysis of *Medicago truncatula*: an effective method for characterizing the plant material used for functional genomics approaches. *Plant Cell Environ* 29: 1087–1098.
- Moreno M.T., Cubero J.I., 1978. Variation in *Cicer arietinum* L. *Euphytica* 27:465-485.
- Morrissey J.P., Osbourn A.E., 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:708-724.
- Muehlbauer F.J, Kaiser W.J., Kusmenoglu I., 1998a. Registration of ‘Sanford’ chickpea. *Crop Science* 38:282.
- Muehlbauer F.J., Kaiser W.J., 2002. Registration of “Evans” chickpea. *Crop Science* 42, 301.
- Nair R.M., Howie J.H., 2006. *Medicago truncatula* cultivars. In : *Medicago truncatula* handbook. [en ligne] (page consultée le 05 février 2016) [https://www.noble.org/globalassets/docs/medicago-handbook/m-truncatula cultivars.pdf](https://www.noble.org/globalassets/docs/medicago-handbook/m-truncatula_cultivars.pdf)
- Navas-Cortés J., Pérez-Artés E. et al., 1998. Mating type, pathotype and RAPDs analysis in *Didymella rabiei*, the agent of ascochyta blight of chickpea. *Phytoparasitica* 26:199–212.
- Navas-Cortés J.A., Trapero-Casas A., Jimenez Diaz R.M., 1995. Survival of *Didymella rabiei* in chickpea straw debris in Spain. *Plant Pathol* 44 (2): 332–339.
- Nene Y.L., 1982. A review of Ascochyta blight of chickpea. *Tropical Pest management* 28 (1):61-70.
- Nene Y.L., 1984. A review of Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Pages 17-23 in: Proc. Workshop Ascochyta Blight Winter Sowing Chickpeas. M.C. Sawena and K.B. Singh, Eds, ICARDA, Aleppo, Syria.
- Nene Y.L, Haware M.P., Reddy M.V., 1981. Chickpea diseases: resistance screening techniques. Information Bulletin No. 10. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi Arid Tropics. 10 pp.
- Nene Y.L., Reddy M.V., 1987. Chickpea diseases and their control. In: Sexena MC, Singh KB, eds. The Chickpea. Wallingford, UK: CAB International, 233–370.
- Nene Y.L., Reddy M.V., Haware M.P., et al. (1991). Field Diagnosis of Chickpea Diseases and their Control. *Information Bulletin* No.28. India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 52 pp.
- Nene Y.L., Reddy M.V., Haware M.P., Ghanekar A.M., et al., 2012. Field Diagnosis of Chickpea Diseases and their Control. *Information Bulletin* No. 28 (révisé). Patancheru, A.P. 502 324, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 60 pp.
- Nene Y.L., Sheila V.K., Sharma S.B., 1996. A world list of chickpea and pigeonpea pathogens. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Nielsen D.C., 2001. Production Functions for chickpea, Field Pea, and Lentil in the Central Plains. *Agron. J.* 93: 563-569. Singh Gurmel, and L.S. Bhushan, 1979. Water use efficiency and yield of

- dryland chickpeas as influenced by P fertilization and stored soil water and crop season rainfall. *Agric. Water Manage* 2: 299-305.
- Niki T., Mitsuhashi I., Seo S., Ohtsubo N., Ohashi Y., 1998. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol* 39: 500-507.
- Nishimura M.T., Stein M., Hou B.H., Vogel J.P., Edwards H., Somerville S.C., 2003. Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* 301: 969–972.
- Njambere E.N., Chen W., Pullman WA, Frate C. et al., 2007. Cultural and DNA-based identification of *Sclerotinia trifoliorum* infecting chickpea in the U.S. *Pisum Genetics*, vol. 39., 2 pp.
- Northcote D.H., Lay, J., Davey, R., 1989. Use of antisera to localize callose, xylan and arabinogalactan in the cell-plate, primary and secondary walls of plant cells. *Planta* 178 (3): 353–366.
- Nourollahi K., Javannikkhah M., Naghavi M., Lichtenzveig M.R., Okhovat S.M., 2011. Genetic diversity and population structure of *Ascochyta rabiei* from the western Iranian Ilam and Kermanshah provinces using MAT and SSR markers. *Mycological Progress* 10 (1):1-7.
- Omri B., Youssef N., Krid S., Rhouma A., Kharrat M., 2010. First report of *Rhizoctonia solani* AG 2-3 on chickpea in Tunisia. *Phytopathol Mediterr* 49:253–257.
- Ozkilinc H., Frenkel O., Shtienberg D., Abbo et al., 2011. Aggressiveness of eight *Didymella rabiei* isolates from domesticated and wild chickpea native to Turkey and Israel, a case study. *Eur. J. Plant Pathol* 131(3): 529-537.
- Ozkilinc H., Frenkel O., Abbo S. et al., 2010. A comparative study of Turkish and Israeli populations of *Didymella rabiei*, the ascochyta blight pathogen of chickpea. *Plant Pathol* 59: 492-503.
- Öztürk M., Duran A., Hakki E., 2013. Cladistic and phylogenetic analyses of the genus *Cicer* in Turkey. *Plant Systematics and Evolution* 299:1955–1966. DOI: 10.1007/s00606-013-0850-6.
- Pande S., Galloway G., Gaur P.M. et al., 2006. Botrytis grey mould of chickpea : A review of biology, epidemiology and disease management. *Austr J Agric Res* 57: 1137-1150.
- Pande S., Narayana Rao J., Sharma M., 2007. Establishment of the Chickpea Wilt Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in the Soil through Seed Transmission. *Plant Pathol Journal* 23(1):3-6.
- Pande S., Sharma M., Krishna Kishore G., Shivram L., Naga Mangala U., 2010. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from chickpea: DNA polymorphisms, cultural, morphological and virulence characteristics. *African Journal of Biotechnology* [Enligne], 9(46):7961-7967, (page consultée le 15/11/2016) <http://www.academicjournals.org/AJB>.
- Pande S., Siddique K.H.M. et al., 2005. Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review of biology, pathogenicity, and disease management. *Australian J Agricultural Res* 56: 317–332.
- Pandey B.K., Singh U.S, Chaube H.S. (1987). Mode of Infection of Ascochyta Blight of Chickpea caused by *Ascochyta rabiei*. *J Phytopathol* 119(1): 88–93.
- Pape S., Thurow C., Gatz C., 2010. The Arabidopsis PR-1 promoter contains multiple integration sites for the coactivator NPR1 and the repressor SNII. *Plant Physiol* 154(4): 1805-1818.

- Pariaud B., Ravigné V., Halkett F. et al., 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathol.* 58: 409–424. 10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x/epdf.
- Pearson C.J., Brown R., Collins W.J., Archer K.A., Wood M.S., Peterson C., Bootle B., 1997. An Australian temperate pastures database. *Austral J Agric Res* 48: 453-466.
- Peever T.L., Salimath S.S., Su G., Kaiser W.J., Muehlbauer J., 2004. Historical and contemporary multilocus population structure of *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) in the Pacific Northwest of the United States. *Molecular Ecology* 13: 291-309.
- Perfect S.E., Hughes H.B., O'Connell R.J., Green J.R., 1999. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genet Biol* 27: 186–198.
- Peumans W.J., Proost P., Swennen R.L., Van Damme E.J.M., 2002. The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins. *Plant Physiol* 130: 1063-1072.
- Plancquaert P.H., Wery J., 1991. Le pois chiche : Culture et utilisation. Brochure Ed. ITCF, Paris, France ; 11 p. Nene YL, Sheila V.K. Sharma S.B., 1996. A world list of chickpea and pigeonpea pathogens. 5th edition, ICRISAT, Patancheru, India. 27p.
- Prosperi J.-M., Oliviers I., Angevain M., Génier G., Nansat P., 1993. Diversité génétique, conservation et utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. En [ligne], http://www7.inra.fr/lecourrier//wp-content/uploads/2013/04/Sauve-qui-peut-n%C2%B004_Prosperi.pdf (page consultée le 20 juin 2016).
- Punithalingam E., Holliday P., 1972. *Ascochyta rabiei*. In *descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*; Commonwealth Mycological Institute: Kew, UK, volume 34, 337 pp.
- Punja Z.K., 2005. Transgenic carrots expressing a thaumatin-like protein display enhanced resistance to several fungal pathogens. *Canadian J Plant Pathol* 27(2): 291-296.
- Ramirez-Suero M., 2009. Etude de l'interaction de *Medicago truncatula* avec *Fusarium oxysporum* et du rôle de l'acide salicylique dans les interactions de la plante avec différents agents pathogènes et symbiotiques [en ligne]. Thèse de doctorat. Toulouse : Université de Toulouse, 281p. Disponible sur : http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00001002/01/ramirez_suero.pdf (page consultée le 08 avril 2014).
- Rapilly F., 1991. L'épidémiologie en pathologie végétale : mycoses aériennes. Paris, INRA Editions.
- Raynal, G., 1972. Contribution à l'étude de *Colletotrichum Dast*, champignon parasite du cotonier. Thèse 3^{ème} cycle, fasc. Sc. Univ. Paris Sud. 60 pp.
- Reddy M.V., Singh K.B., 1984. Evaluation of a world collection of chickpea gemplasm lines for resistance to ascochyta blight. *Plant Dis* 68: 900-901.
- Reddy M.V., Kabbabeh, 1985. Pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. In Syria and Lebanon. *Phytopath Medit.* 24: 265-266.

- Rhaïem A., Cherif M., 2006. First Report of *Didymella rabiei* on Chickpea Debris in Tunisia. *Tunisian J Plant Protect* 1: 13-18.
- Rhaïem A., Cherif M., Dyer P.S., Peever T.L., 2007. Distribution of mating types and genetic diversity of *Ascochyta rabiei* populations in Tunisia revealed by mating-type-specific PCR and random amplified polymorphic DNA markers. *J Phytopathol* 155: 596–605.
- Rhaïem A., Cherif M., Peever T.L., Dyer P.S., 2008. Population structure and mating system of *Ascochyta rabiei* in Tunisia: evidence for the recent introduction of mating type 2. *Plant Pathol* 57:540–51.
- Rubio J., Martinez C., Gil J., Moreno M.T., 2004. Registration of ascochyta blight and fusarium wilt resistant CA2954 kabuli chickpea germplasm. *Crop Science* 44: 1881–1882.
- Saiki R. K., Faloona F., Mullis K. B. et al., 1985. Enzymatique amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Saiki R.K., Gelfand DH ; Stoffel S. ; Sharf S.G., Higushi, R., 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Salzer P., Bonanami A., Beyer K. et al., 2000. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation and pathogen infection. *Mol. Plant Microbe* 13: 763-777.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratories Press, pp. 874-895.
- Santra D.K., Singh G., Kaiser W.J. et al., 2001. Molecular analysis of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., the pathogen of Ascochyta blight in chickpea. *Theoret Appl Gene* 102: 237-245.
- Sarwar N., Ashfaq S., Akhtar K.P., Jamil F.F., 2013. Biological Pathotyping And RADP Analysis of *Ascochyta rabiei*, From Various Chickpea Growing Areas of Pakistan. *J Anim Plant Sci* [en ligne], 23(3):882-887. <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-23-3/33.pdf>.
- Sattar A., 1933. On the occurrence, perpetuation and control of gram (*Cicer arietinum* L.) blight caused by *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab., with special reference to Indian conditions. *Ann Appl Biol* 20: 612-632.
- Saxena M.C., 1987. Agronomy of chickpea. Pages 207-232 in The chickpea (Saxena, M . C, and Singh, K.B., eds.). Wallingford, Oxon , UK: CAB International.
- Scalbert A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30: 3875-3883.
- Schlumbaum A., Mauch F., Vogeli V., Boller, T., 1986. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature, London* 324:365-367.
- Schmit J.P., 2002. Trade offs between reproduction and mycelium production in the unit-restricted decomposer *Coprinus cinereus*. *Mycologia* 94(1): 40-48.
- Schwinghamer M.W., Larsen R.C., 2011. Viruses reported to infect chickpea and/or lentil naturally. In: Chen W, Sharma HC, Muehlbauer FJ (eds) Compendium of chickpea and lentil diseases and pests. APS Press, St. Paul, MN, USA, pp 73–76.

- Sels J., Mathys J., De Coninck B.M., Cammue B.P., De Bolle M.F., 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem* 46(11): 941-50.
- Shah T.M., El Hassan M.U, Haq M.A., Hinna A., 2005. Evaluation of *Cicer* species for resistance to *Ascochyta* blight. *Pak J Botany* 37(2): 431-438.
- Sharma K.D., Muehlbauer F.J., 2007. Fusarium wilt of chickpea: physiological specialization, genetics of resistance and resistance gene tagging. *Euphytica* 157, 1-14.
- Sharma M., Ghosh R., 2016. An Update Genetic Resistance of Chickpea to *Ascochyta* blight. *Agronomy*, [en ligne], 6(18): 1-15, (page consultée le 7 novembre 2016). <http://oar.icrisat.org/9378/1/agronomy-06-00018.pdf>.
- Shtienberg D., Kimber R.B.E., Mc Murray L., Davidson J.A., 2006. Optimisation of the chemical control of *ascochyta* blight in chickpea. *Austral Plant Pathol* 35(6): 715-724.
- Shroeder B.K., 2011. Diseases caused by bacteria and phytoplasma. In: Chen W, Sharma HC, Muehlbauer FJ (eds). Compendium of chickpea and lentil diseases and pests. APS Press, St. Paul, MN, USA, pp 92-94.
- Singh K.B. (1987). In: The chickpea, pp 127-162 (eds. M.C. Saxena and K.B. Singh) Wallingford, Oxon.
- Singh G., Bhushan L.S., 1979. Water use efficiency and yield of dryland chickpeas as influenced by P fertilization and stored soil water and crop season rainfall. *Agric. Water manage* 2: 299-305.
- Singh F., Diwakar B., 1995. Chickpea Botany and Production Practices. Manual. Skill development series no. 16. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics Patancheru, Andhra Pradesh, India.
- Singh K.B., Hawtin G.C., Nene Y.L., Reddy M.V., 1981. Resistance in chickpea to *ascochyta* blight. *Plant Dis* 65: 586-587.
- Singh K.B., Reddy M.V., 1983. Inheritance of resistance to *Ascochyta* blight in chickpea. *Crop Sci* 23: 9-10.
- Singh K.B., Reddy, M.V., 1989. Genetics of resistance to *Ascochyta* blight in four chickpea lines. *Crop Sci* 29: 657-659.
- Singh K.B., Reddy M.V., 1990. Patterns of resistance and susceptibility to races of *Ascochyta rabiei* among germplasm accessions and breeding lines of chickpea. *Plant Disease* 74: 127-129.
- Singh K.B., Reddy M.V., 1991. Advances in disease resistance breeding in chickpea. *Advanced Agronomy* 45: 191-222.
- Singh K.B., Reddy M.V., 1993. Sources of resistance to *ascochyta* blight in wild *Cicer* species. *Eur. J. Plant Pathol* 99: 163-167.
- Singh K.B., Reddy M.V., Haware M.P., 1989. Breeding for resistance to *ascochyta* blight in chickpea. In: Disease Resistance Breeding in Chickpea, Eds K.B. Singh and M.C. saxena, ICARDA.
- Singh G., Singh K.B., Kapoor S., 1982. Screening for sources of resistance to *Ascochyta* blight of chickpea. *International Chickpea Newsletter* 6: 15-17.

- Skinner D.Z., Bauchan G.R., Auricht G. Hughes S., 1999. Developing a core collection from a large annual Medicago germplasm collection. In: R.C. Johnson and T. Hodgkin (eds.) Core collections for today and tomorrow. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Slama F., 1998. *Les cultures industrielles et les légumineuses à graines*. Tunis: Ed. CUD.
- Small E., 2011. Alfalfa and relatives: evolution and classification of Medicago. NRC Research Press, Ottawa, Ontario, Canada, 727pp.
- Smithson J.B., Thompson J.A, Summerfield R.J., 1985. Chickpea (*Cicer arietinum* L.). p. 312-390. In: R.J. Summerfield and E.H. Roberts (eds.), Grain Legume Crops. Collins, London, UK. Lie, T.A. 1971. *Plant and Soil*, Special volume, 117-127.
- Staginnus C., Winter P., Desel C., Schmidt T., Kahi G., 1999. Molecular structure and chromosomal localization of major repetitive DNA families in chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. *Plant mol Biol* 39:1037-1050.
- Stenglein S.A., Arambarri A.M., Sevillano M.D., Balatti P.A., 2005. Leaf epidermal characters related with plant's passive resistance to pathogens vary among accessions of wild beans *Phaseolus vulgaris* var. aborigineus (Leguminosae-Phaseoleae). *Flora* 200: 285-295.
- Stone B.A., Clarke A.E., 1992. Chemistry and Biology of (1 fi 3)-b-D-Glucans. Victoria, Australia, La Trobe University Press.
- Stotz H.U., Wang Y., Spence B., 2009. A defensin from tomato with dual function in defence and development. *Plant Mol Biol* 71: 131–143.
- Stuteville D.L., Graves W.L., Dixon L.J., Castlebury L.A., Minnis A. M., 2010. *Uromyces ciceris-arietini*, the cause of chickpea rust: New hosts in the Trifolieae, Fabaceae. *Plant Dis* 94:293-297.
- Summerfield R.J., Minchin F.R., Roberts E.H., Hadley P., 1979. The effect of photoperiod and air temperature on the growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). in: Workshop International sur l'amélioration du pois chiche, ICRISAT, Hyerabad, India, 28 Feb-2 march.
- Sun S.L., Zhu Z.D., 2016. Occurrence of Ascochyta Blight Caused by *Ascochyta rabiei* on Chickpea in North China. *Plant Disease* 100(7):1494.
- Tagu D., Moussard C., 2003. Principes des techniques de biologie moléculaire, INRA Editions, Mieux comprendre, INRA, Paris.
- Takakura Y., Ito T., Saito H., Inoue T., Komari T., Kuwata S., 2000. Flower-predominant Thomson S.V., 2000. Epidemiology of fire blight. In: Vanneste J, ed. Fire Blight: the Disease and its Causative Agent *Erwinia amylovora*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 9-36.
- Tenhaken R., 1992. Virulenzfaktoren phytopathogener Pilze Biochemische und molecularbiologische Untersuchungen zur Infektion der Kichererbse durch *Ascochyta rabiei*. Dissertation, Universität Münster, Münster, Germany.
- Thavarajah D., Ball A.R., Schoenau J.J., 2005. Nitrogen Fixation, Amino Acid, and Ureide Associations in Chickpea. *Crop Science* 45:2497-2502, Wageningen, Netherland.

- Thevissen K., Warnecke D.C., François I.E., et al., 2004. Defensins from Insects and Plants Interact with Fungal Glucosylceramides. *J Biol Chem* 279(6): 3900-5.
- Thomas M.R., Rose R.J., Nolan K.E., 1992. Genetic transformation of *Medicago truncatula* using Agrobacterium with genetically modified Ri and disarmed Ti plasmids. *Plant Cell Rep* 11: 113-117.
- Thrall P.H., Barretta L.G., Burdona J.J., Alexander H.M., 2005. Variation in pathogen aggressiveness within a metapopulation of the *Cakile maritima*–*Alternaria brassicicola* host–pathogen association. *Plant Pathol* 54: 265–274.
- Tivoli B., Banniza S., 2007. Comparison of the epidemiology of ascochyta blights on grain legumes. *Eur J Plant Pathol* 119: 59–76.
- Tognolli M., Penel C., Greppin H., Simon P., 2002. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288:129-138.
- Toker C., 2009. A note on the evolution of kabuli chickpeas as shown by induced mutations in *Cicer reticulatum* Ladizinsky. *Genet Resour Crop Evol* 56: 7-12.
- Toker C., Uzun B., Ceylan F.O., Ikten C., 2014. Chickpea. In: Alien Gene Transfer in Crop Plants, A. Pratap and J. Kumar Eds., Volume 2, Springer, Dordrecht, pp:121-151.
- Trapero-Casas A., Jiménez-Díaz R.M., 1985. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. *Phytopathology* 75:1146–51.
- Trapero-casas A., Kaiser W.J., 1992b. Development of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea straw. *Phytopathology* 82(11): 1261-1266.
- Trapero-Casas, A., Kaiser W. J., 2007. Differences between ascospores and conidia of *Didymella rabiei*. in spore germination and infection of chickpea. *Phytopathology* 97: 1600–1607.
- Trapero-Casas A., Kaiser W.J., 1987. Factors influencing development of the teleomorph of *Ascochyta rabiei*. *Int Chickpea Newslett* 17: 27–28.
- Traperos-casas A., Kaiser W.J., Ingram D.M., 1990. Control of Pythium Seed Rot and Preemergence Damping-off in the U.S. Pacific Northwest and Spain. *Plant Disease* 78(8): 563-569.
- Türkkan M., Dolar F.S., 2009. Determination of pathogenic variability of *Didymella rabiei*, the agent of ascochyta blight of chickpea in Turkey. *Turk J Agric Forestry* 33: 585-591.
- Türkkan M., Dolar F.S., Şenyuva H.Z., Özcan S., 2011. Determination and identification of the solanapyrones and new metabolites from *Ascochyta rabiei*. *Agriculture* 98(4): 439-444.
- Turpin A. E.J., Herridg F.D., Robertson J.M., 2002. Nitrogen fixation and soil nitrate interactions in field-grown chickpea (*Cicer arietinum*) and faba bean (*Vicia faba*). *Aust J Agric Res* 53: 599–608.
- Udupa S., Weigand F., Saxena M., Kahl G., 1998. Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the ascochyta blight pathogen. *Theor Applied Genet* 97: 299-307.
- Udupa S.M., Weigand F., 1997. Pathotyping of *Ascochyta rabiei* isolates of Syria. In S.M. Udupa & F. Weigand (eds.), *DNA markers and breeding for resistance to ascochyta blight in chickpea*.

- Proceedings of the Symposium on “Application of DNA Fingerprinting for Crop Improvement: Marker-assisted Selection of Chickpea for Sustainable Agriculture in the Dry Areas, Aleppo 1994, 39-48.
- Vailleau F., Sartorel E., Jardinaud M.F. *et al.*, (2007). Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* the model legume plant *Medicago truncatula*. *Mol Plant Micro Interact* 20: 159-67.
- Uppalapati S.R., Marek S.M., Lee H.K., Nakashima J. *et al.*, 2009. Global gene expression profiling during *Medicago truncatula*-*Phymatotrichopsis omnivora* interaction reveals a role for jasmonic acid, ethylene, and the flavonoid pathway in disease development. *Mol Plant Microbe Interact* 22(1):7-17. doi: 10.1094/MPMI-22-1-0007.
- Van Der Maesen L.J.G., 1972. *Cicer* L., A Monograph of The Genus, With Special Reference to the Chickpea (*Cicer arietinum* L.), Its Ecology and Cultivation. Meded. Landbouwhoges. Wageningen 72(10): 342p. <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/195431>.
- Van Der Maesen L.J.G., Maxted N., Javadi F., Coles S., Davies A.M.R., 2007. Taxonomy of the genus *Cicer* revisited. In: Yadav, S.S., Redden, B., Chen, W., Sharma, B. (eds), Chickpea breeding and management. CAB International, Wallingford, pp. 14-28. <http://www.fieldcrops.org/assets/pdf/product512cbd51831a3.pdf>.
- Van Der Plank J. E., 1968. La résistance des plantes aux maladies. Traduit de l’anglais par H. Barat. Ed. Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris, 223 p.
- Vanderschuren H., Lentz E., Zainuddin I., Gruissem W., 2013. Proteomics of model and crop plant species: status, current limitations and strategic advances for crop improvement. *J Proteom* 93:5–19.
- Van Etten H.D., Mansfield J.W., Bailey J.A., Farmer E.E., 1994. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus “phytoanticipins”. *Plant Cell* 6: 1191-1192.
- Van Loon L.C., Pierpoint W.S., Boller T., Conejero V., 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol Rep* 12: 245-264.
- Varshney RK, Hiremath PJ, Lekha P, Kashiwagi J, Balaji J, Deokar AA, Vadez V, Xiao Y, Srinivasan R, Gaur PM, Siddique KHM, Town CD, Hoisington DA. (2009). A comprehensive resource of drought-and salinity responsive ESTs for gene discovery and marker development in chickpea (*Cicer arietinum* L.) *BMC Genomics*.10:523. doi: 10.1186/1471-2164-10-523.
- Verret, 1982. Etude de quelques légumineuses à gousses graines adaptées au semis de printemps dans la zone méditerranéenne. Mémoire D.E.A. ENSA Montpellier, 72p.
- Viotti G., Carmona M.A., Scandiani *et al.*, 2012. First Report of *Ascochyta rabiei* Causing *Ascochyta* Blight of Chickpea in Argentina. *Plant disease* 96 (9): 1375.
- Vir S., Grewal J.S., 1974. Physiological specialization in *Ascochyta rabiei*, the causal organism of gram blight. *Indian Phytopathol* 27: 265–266.

- Vir S., Grewal J.S., Gupta V.P. (1975). Inheritance of resistance to ascochyta blight in chickpea. *Euphytica* 24:209-211.
- Wang H., Hwang S.F., Chang K.F., Turnbull G.D., Howard R.J., 2003. Suppression of important pea by diseases by bacterial antagonists. *Biocontrol* 48:447-460.
- Warner S.A.J., Scott R., Draper J., 1992. Characterisation of a wound-induced transcript from monocot asparagus that shares similarity with a class of intracellular pathogenesis-related (PR10) proteins. *Plant Mol Biol* 19: 555-561.
- Wery J., 1986. Un pois pas si chiche que cela ! Bulletin FNAMS; *Semences* 97: 32-35.
- Williams S.J., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski A., Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531- 6535.
- Wise K.A., Bradley C.A., Markell S., Pasche J., et al., 2011. Sensitivity of *Ascochyta rabiei* populations to prothioconazole and thiabendazole. *Crop Protection* 30: 1000-1005.
- White D., Chen W.D., 2006. Genetic transformation of *Ascochyta rabiei* using Agrobacterium-mediated transformation. *Current Genetics* 49: 272-280.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J. Sninsky & T.J. White (eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and amplifications (pp. 315-322). New York, NY, USA. Academic Press.
- Wood J.A, Grusak M.A., 2007. Nutritional value of chickpea. In Chickpea breeding and management. pp. 101-142 [SS Yadav, R Redden, W Chen and B Sharma, editors]. Wallingford, UK: CAB International.
- Wood J.A., Knights E.J., Chocty M., 2011. Morphology of Chickpea Seeds (*Cicer arietinum* L.): Comparison of desi and kabuli Types. *Int J Plant Sci* 172 (5): 632-643.
- Xu P., Blancaflor E.B., Roossinck M.J., 2003. In spite of induced multiple defense responses, tomato plants infected with Cucumber mosaic virus and D satellite RNA succumb to systemic necrosis. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 467-476.
- Yadav S.S., Redden R.J., Chen W., Sharma B., 2007. Chickpea Breeding and Management. CAB International, Oxfordshire, UK. ISBN 1-84593-213-7.
- Yang S., Gao M., Xu C., Gao J., Deshpande S., Lin S., Roe B.A., Zhu H., 2008. Alfalfa benefits from *Medicago truncatula*: The RCT1 gene from *M. truncatula* confers broad-spectrum resistance to anthracnose in alfalfa [en ligne]. *PNAS*, 105(34): 12164-12169. (page consultée le 15 novembre 2016) <http://www.pnas.org/content/105/34/12164.full.pdf>.
- Yedidia I., Benhamou N., Chet I., 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Micr* 65:1061-70.
- Zachos D.G., Panagopoulos C.G., Markis E.T., 1963. Recherches sur la biologie, l'épidémiologie et la lutte contre l'antracnose du pois-chiche. *Ann Inst Phytopathol Banaki* 5: 167-192.
- Zane L., bargelloni L., Patarnello T., 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review.

- Zerroug M.M., Bouznad Z., Larous L., Strange, R.N., 2007. Production of solanapyrone a by Algerian isolates of *Ascochyta rabiei* as the cause of the toxicity of culture filtrates to chickpea (*Cicer arietinum*) seeds and seedlings. *J Plant Pathol* 89(2): 227-232.
- Zeyen R.J., Carver T.L.W., Lyngkjær MF., 2002. The formation and role of papillae. In: Be'linger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Timothy LW (eds), *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*, pp. 107– 125, Carver APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Zhu H., Choi H.K., Cook D.R., Shoemaker R.C., 2005. “Bridging model acrop legumes through comparative genomics,” *Plant Physiol* 137(4):1189–1196.
- Zikara-Zine F., Bouznad Z., 2007. Virulence et groupes de compatibilité dans les isolats de *Ascochyta rabiei* en Algérie. Ed. INRA Algérie- *Recherche Agronomique* 19: 48-55.
- Zine-Zikara F., Bouzid L., Yekkour A., 2015. Le pois chiche en Algérie : situation, potentialités et perspectives. *Recherche Agronomique* 27: 35-47.
- Zohary D., Hopf M., Weiss E., 2012. *Domestication of Plants in the Old World*. Oxford University Press, Oxford.

ANNEXES

Annexe 1

Protocole pour la coloration d'hyphes de champignon sur et dans des feuilles infectées

1. Fixation et décoloration des tissus

découper un carré contenant le site d'inoculation (plus petite qu'une lamelle couvre-objet)

incuber dans un petit volume (1-3 ml) de mélange chloroforme/éthanol 1:3, changer la solution de temps en temps jusqu'à décoloration complète de la feuille (ça dure environ 1-2 jours suivant le matériel végétal)

2. Préparation de la solution de coloration

solution stock de bleu d'aniline 1% : 0,1g Aniline Blue dans 10 ml d'eau distillée.

Préparer la solution de coloration en diluant le bleu d'aniline dans du lactophénol d'Amman, à une concentration finale de 0,025% (1ml bleu d'aniline pour 40 ml lactophénol).

Solution de lactophénol : nous utilisons une solution de lactophénol d'Amman commercialisé, mais on peut la préparer soi-même.

Sa composition : Phénol 10 ml ; acide lactique 10 ml ; glycérine 20 g ; eau distillée 10 ml ; conserver dans un flacon brun, de préférence au frigo

3. Coloration

incuber le carré de tissu décoloré dans un petit volume de bleu d'aniline-lactophénol pendant la nuit

4. Observation

placer le carré de feuille sur une lame de microscopie, dans une goutte de glycérol 25%, couvrir avec une lamelle, observer au microscope.

La solution de bleue d'Aniline-lactophénol d'Amman est conservée à 4°C.

Annexe 2

Tampon au CTAB

20 g/l CTAB	4 g
1,4 M NaCl	16,4 g
0,1 M Tris-HCl	3,5 g
20 mM Na ₂ EDTA	1, g

- Ajouter 100 ml d'eau déionisée
- Ajuster le pH à 8,0 en ajoutant 1 M NaOH
- Complétez pour obtenir 200 ml et stérilisez
- Conserver le tampon à 4°C pendant maximum 6 mois.

1 M TRIS-HCl pH=8,0

	[C] finale	100 ml
TRISMA [®] Base (MW=121,1)	1 M	12,11 g
HCl 12 N R.P. NORMAPUR		~_ 4,2
qsp H ₂ O UHQ		100 ml

Ajuster le pH à 8 avec HCl concentrée, compléter avec H₂O UHQ

TE pH=8

	[C] finales	100 ml	250 ml
1 M TRIS-HCl pH=8	10 mM	1 ml	2,5 ml
0,5 M EDTA pH=8	1 mM	200 µl	500 µl
qsp H ₂ O UHQ		100 ml	250 ml

Autoclaver

0,5 M EDTA pH= 8

	[C] finale	100 ml
Na ₂ EDTA 2H ₂ O (MW=372,2)	0,5 M	18,61 g
qsp H ₂ O		100 ml

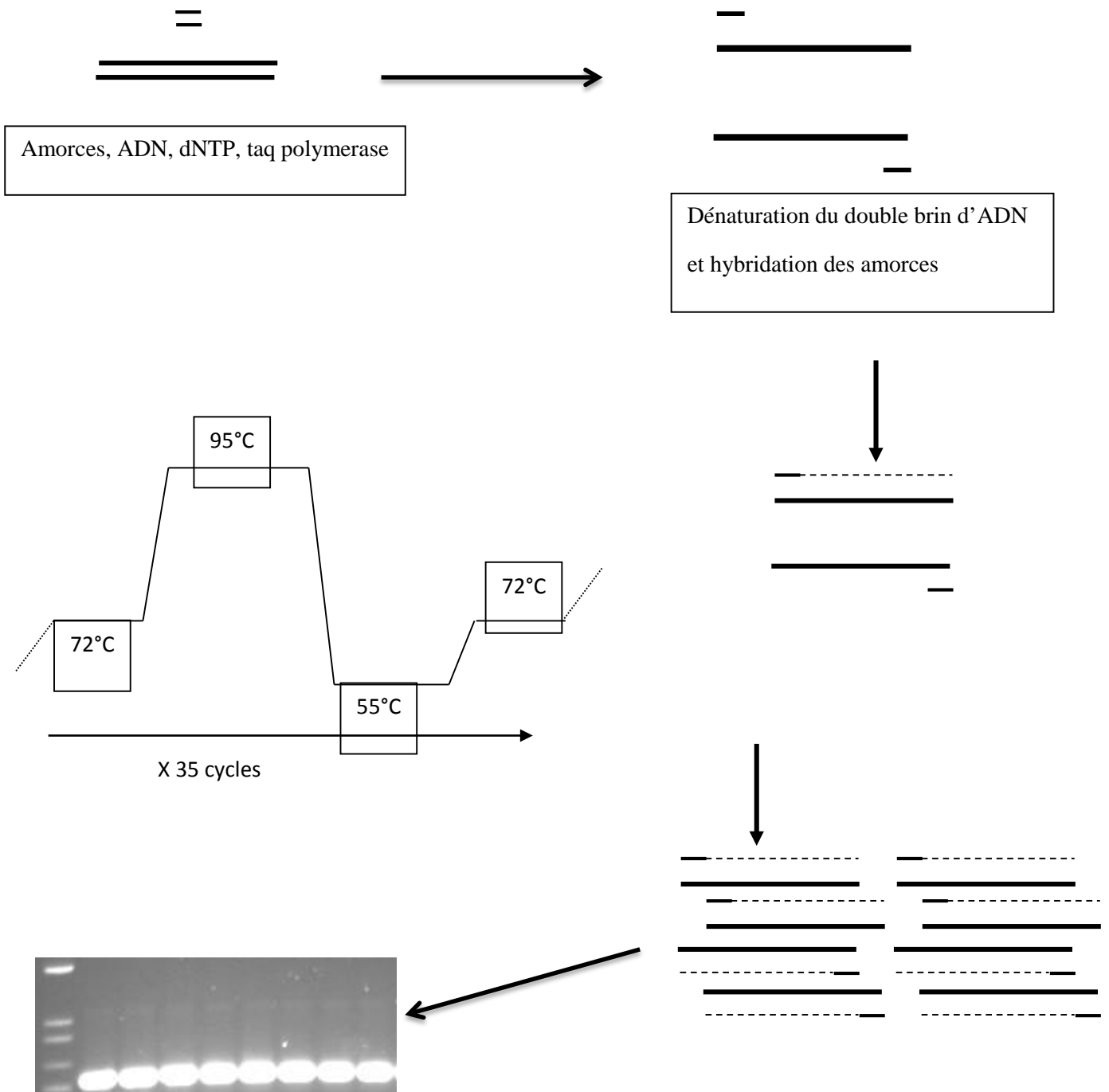
Ajuster le pH à 8 avec NaOH concentrée. La dissolution de l'EDTA est facilitée par l'ajout de soude.

Commencer à ajuster le pH avant dissolution complète de l'EDTA. Compléter avec H₂O UHQ.

Autoclaver.

Annexe 3

Principe de la PCR conventionnelle



Annexe 4

Dosage d'ARN au Nanodrop et vérification de sa qualité

Première répétition biologique

Echantillon	Concentration d'ARN [ng/µl]	260/280	260/230
To A17	944,14	1,95	1,29
A17-24 h	1371,57	1,97	1,67
A17-24 h témoin	1221,57	1,93	1,35
A17-48 h	977,69	1,93	2,13
A17-48 h témoin	1751,56	2,02	1,70
A17-72 h	1416,63	1,90	0,97
A17-72 h témoin	699,73	1,94	1,48
T0 F83005.5	1326,73	1,94	1,08
F83005.5- 24 h	1711,50	1,95	1,34
F83005.5- 24 h témoin	2022,87	1,99	2,11
F83005.5- 48h	1886,9	1,97	2,35
F83005.5- 48 h témoin	1039,04	1,93	2,35
F83005.5- 72 h	1269,13	1,95	1,03
F83005.5- 72 h témoin	1213,25	1,95	1,29

Deuxième répétition biologique

Echantillon	Concentration d'ARN [ng/µl]	260/280	260/230
To A17	1093,88	1,98	1,93
24 h	1803,19	1,99	1,97
24 h témoin	1355,32	1,93	1,32
48 h	1338,02	2,00	2,01
48 h témoin	1840,38	1,93	1,33
72 h	739,17	1,90	1,25
72 h témoin	2080,15	1,94	1,51
T0 F83	1326,73	1,94	1,08
F83 24 h	1711,50	1,95	1,34
F83 24 h témoin	2022,87	1,99	2,11
F83 48h	1886,9	1,97	2,35
F83 48 h témoin	1039,04	1,93	2,35
F83 72 h	1369,13	1,95	1,03
F83 72 h témoin	1213,25	1,95	1,29

Troisième répétition biologique

Echantillon	Concentration d'ARN [ng/µl]	260/280	260/230
To A17	1689,18	1,97	1,08
A17-24 h	1431,94	1,99	0,95
A17-24 h témoin	1619,32	2,03	1,38
A17-48 h	904,27	1,98	0,86
A17-48 h témoin	1302,54	2,05	1,37
A17-72 h	1650,09	2,02	0,89
A17-72 h témoin	958,27	2,04	1,01
T0 F83	1206,41	1,98	0,88
F83005.5- 24 h	1581,31	2,04	1,26
F83005.5- 24 h témoin	1226,00	2,04	1,7
F83005.5- 48h	1051,64	2,02	0,81
F83005.5- 48 h témoin	1144,19	1,98	0,78
F83005.5- 72 h	1119,86	2,00	0,98
F83005.5- 72 h témoin	462,45	1,92	0,99

Annexe 5

Test de Newman-Keuls au seuil de 5% pour la croissance mycélienne

Isolats	C1	B1	C2	M1	R3	C3	Z1	Z3
Croissance	54,5 ^a	48,58 ^b	44,66 ^c	42 ^d	41,75 ^d	40,67 ^e	38,17 ^f	38 ^f
Isolats	M2	Z2	A3	R2	A2	R1	A1	B2
Croissance	35,33 ^g	34,25 ^h	33,81 ^{hi}	33,42 ^{hi}	33,08 ⁱ	32,16 ^j	32 ^j	30,75 ^k

Annexe 6

Test de Newman-Keuls au seuil de 5% pour la taille des conidies

Isolats	A1	A2	A3	B1	B2	C1	C2	C3
Longueur	10,87 ^{bcd} ±1,82	10,73 ^{bcd} ±1,84	10,47 ^{de} ±1,61	10,39 ^{def} ±2,06	9,59 ^f ±1,98	10,51 ^{cde} ±2,5	11,17 ^{bcd} ±1,95	12,14 ^a ±1,83
largeur	5,9 ^{cd} ±0,1	6 ^{bc} ±0	6,16 ^b ±0,27	5,66 ^{de} ±0,41	6,12 ^b ±0,19	5,7 ^{de} ±0	5,6 ^{ef} ±0	6,34±0,13
Isolats	M1	M2	R1	R2	R3	Z1	Z2	Z3
Longueur	10,17 ^{ef} ±2,01	10,11 ^{ef} ±2,15	10,14 ^{ef} ±1,99	10,99 ^{bcd} ±2,16	10,31 ^{def} ±1,81	11,53 ^b ±1,85	11,35 ^{bc} ±2,06	11,16 ^{bcd} ±2,12
largeur	5,38 ^f ±0,21	5,38 ^f ±0,27	5,41 ^f ±0,24	5,73 ^{de} ±0,05	5,73 ^{de} ±0,31	5,84 ^{cde} ±0,12	5,64 ^{de} ±0,13	5,80 ^{cde} ±0,04

Annexe 7

Test de Newman-Keuls au seuil de 5 % pour la sporulation des isolats

Isolats	R3	B2	R1	Z1	A3	Z2	R2	A2
Sporulation	2,52 ^a ±0,13	2,48 ^{ab} ±0,11	2,39 ^b ±0,02	1,68 ^c ±0,03	1,35 ^d ±0,02	1,31 ^d ±0,05	1,24 ^d ±0,01	1,00 ^e ±0,03
Isolats	Z3	B1	C1	A1	M2	M1	C2	C3
Sporulation	0,93 ^e ±0,01	0,75 ^f ±0,03	0,51 ^g ±0,01	0,49 ^g ±0,02	0,38 ^h ±0,01	0,17 ⁱ ±0	0,13 ⁱ ±0	0,13 ⁱ ±0

Annexe 8

Corrélation de Pearson :

Agressivité-Sporulation

	Agressivité	Sporulation
Agressivité	1,00	-0,27
Sporulation	-0,27	1,00

Compte rendu :

StatBox version 6.40 - Matrice de similarité/dissimilarité

Données : Agressivité /Sporulation

Les calculs sont effectués en croisant les colonnes

Aucune donnée manquante détectée

Corrélation de Pearson (similarité dans l'intervalle [-1,+1])

Croissance mycélienne-sporulation

	Sporulation	Croissance
Moy_Spor	1,00	-0,42
moy_Croiss	-0,42	1,00

Compte rendu :

StatBox version 6.40 - Matrice de similarité/dissimilarité

Données : Moyenne de sporulation/moyenne de croissance

Les calculs sont effectués en croisant les colonnes

Aucune donnée manquante détectée

Corrélation de Pearson (similarité dans l'intervalle [-1,+1])

Annexe 9

Test de Newman et Keuls au seuil de 1 % pour l'indice de maladie (IM) sur onze lignées de pois chiche

F1 : Isolats

Isolats							
M2	C3	R3	C2	B1	C1	R2	A2
7,45 ^a ±0,1	7,23 ^a ±0,64	6,30 ^b ±0,72	5,65 ^c ±0,71	5,53 ^{cd} ±0,42	5,47 ^{cd} ±0,71	5,32 ^d ±0,68	5,03 ^e ±0,52
Isolats							
A3	R1	Z2	Z1	B2	Z3	M1	A1
4,82 ^{ef} ±0,43	4,72 ^{fg} ±0,54	4,58 ^{fgh} ±0,58	4,49 ^{ghi} ±0,54	4,42 ^{hi} ±0,37	4,31 ^{hi} ±0,44	4,28 ^{hi} ±0,56	4,26 ⁱ ±0,37

F2 : Lignées

Lignées					
ILC 263	ILC 1929	ILC 7795	ILC 482	ILC 483	ILC 249
7,17 ^a ±0,51	7,10 ^a ±0,43	5,59 ^b ±0,64	5,27 ^c ±0,55	4,86 ^d ±0,52	4,86 ^d ±0,58
Lignées					
ILC 484	ILC 9393C	ILC 8068	ILC 3996	ILC 3279	
4,80 ^d ±0,51	4,75 ^d ±0,61	4,63 ^d ±0,55	4,37 ^e ±0,55	4,26 ^e ±0,60	

Annexe 10

Test de Newman-Keuls au seuil de 1 % pour la pathogénicité des isolats sur trois lignées de pois chiche différentielles

Facteur 1 : Isolats

Isolats							
C3	M2	C1	A3	R3	C2	A2	B1
7,79 ^a	7,56 ^a	6,33 ^b	6,11 ^b	6,00 ^{bc}	5,89 ^{bc}	5,67 ^{bc}	5,67 ^{bc}
Isolats							
R2	R1	Z2	M1	A1	Z1	B2	Z3
5,56 ^{bc}	5,11 ^{cd}	5,11 ^{cd}	4,44 ^{de}	4,33 ^{de}	4,33 ^{de}	4,22 ^{de}	3,89 ^e

Facteur 2 ; Lignées

Lignées		
ILC 1929	ILC 482	ILC 3279
8,12 ^a	5,02 ^b	3,35 ^c

Annexe 11

>B1_ITS1_1 status=Passed nucl=518 crlStart=17 crlStop=518 crlLen=502
order=COL12-01YH

gaatttcctaagcttgTTGGGCTTTGCCCGCTACCTCTTACCCATGTCTT
TTGAGTACTTACGTTTTCTCGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGACAAAATC
AAACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTACAAC
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT
GCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCA
TTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCG
TGTAGACTCGCCTTAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTTCGGAGCG
CAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATAACGACGACGTCCAAAAGTACATT
TTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCCGCTGAACTTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGGAA

>B1_ITS4_11 status=Passed nucl=516 crlStart=10 crlStop=516 crlLen=507
order=COL12-01YH

gggggacatGGACCTACTGATCGAGGTCAGAGTGTA AAAATGTACTTTTG
GACGTCGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATC
AATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAGAGGCGAG
ACAAACACCCAACACCAAGCAAAGCTTGAAGGTACAAATGACGCTCGAAC
AGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTG
ATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGT
TCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTA ACTAT
TATGTTTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTGATTTTGTCCAA
TCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGACATGGGTA
AGAGGTAGCGGGCAAAGCCCACAAACTCTAGGTAATGATCCTTCCGCAGG
TTCACCCTACGGAAGG

>B2_ITS1_2 status=Passed nucl=522 crlStart=20 crlStop=522 crlLen=503
order=COL12-01YH

gggttttttaaatTTTGTGTTGGGCTTTTGCCCGCTACCTCTTTACCCATG
TCTTTTGTAGTACTTACGTTTTCTCGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGACAA
AATCAAACCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTAC
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
TGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGC
GTCATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTC
TGCGTGTAGACTCGCCTTAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTTCGG
AGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATAACAACGACGTCCAAAAGTA
CATTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCCGCTGAACTTA
AGCATATCAATAAGCGGAGGAA

>B2_ITS4_12 status=Passed nucl=520 crlStart=16 crlStop=520 crlLen=505
order=COL12-01YH

tgggagagggggaatCCTACTGATCGAGGTCAAGAGTGTA AAAATGTACT
TTTGGACGTCGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGA
AATCAATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAGAGG
CGAGACAAACACCCAACACCAAGCAAAGCTTGAAGGTACAAATGACGCTC
GAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGA
TTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCT
GCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAA
CTATTATGTTTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTGATTTTGT
CCAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGACATG
GGTAAGAGGTAGCGGGCAAAGCCCACAAACTCTAGGTAATGATCCTTCCG
CAGGTTACCCTACGGAAGG

>R1_ITS1_3 status=Passed nucl=523 crlStart=24 crlStop=523 crlLen=500
order=COL12-01YH
gagggaccccatcaaattttgtgGGCTTTGCCCGCTACCTTCTTACCCAT
GTCTTTTGGAGTACTTACGTTTCTCGGCGGGTCCGCCCGCGATTGGACA
AAATCAAACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTA
CAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT
TTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAG
CGTCATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCT
CTGCGTGTAGACTCGCCTTAAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTG
GAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATAACGACGACGTCCAAAAGT
ACATTTTTTACTCTTGCCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTT
AAGCATATCAATAAGCGGAGGAA.

>R1_ITS4_13 status=Passed nucl=521 crlStart=21 crlStop=521 crlLen=501
order=COL12-01YH
gggtggacaggggggatcctACCTGATCCGAGGTCAGAGTGTA AAAATGT
ACTTTTGGACGTCGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTC
CGAAATCAATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAG
AGGCGAGACAAACACCCAACCAAGCAAAGCTTGAAGGTACAAATGACG
CTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAA
AGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTT
GCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTG
TAACTATTATGTTTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTGATTT
TGTCCAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGAC
ATGGGTAAGAGGTAGCGGGCAAAGCCCACAAACTCTAGGTAATGATCCTT
CCGCAGGTTACCTACGGAAG.

>R2_ITS1_10 status=Passed nucl=522 crlStart=20 crlStop=522 crlLen=503
order=COL12-01YH
tgggatattagactttgagGGGCTTTTGCCCGCTACCTCTTACCCATGTC
TTTTGAGTACTTACGTTTCTCGGCGGGTCCGCCCGCGATTGGACAAAA
TCAAACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTACAA
CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGT
CATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTG
CGTGTAGACTCGCCTTAAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTGCGAG
CGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATAACGACGACGTCCAAAAGTACA
TTTTTACTCTTGCCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAAG
CATATCAATAAGCGGAGGAAAG

>R2_ITS4_20 status=Passed nucl=519 crlStart=17 crlStop=519 crlLen=503
order=COL12-01YH
ggggggaacaacggacTACCTGATCCGAGGTCAGAGTGTA AAAATGTACT
TTTGGACGTCGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGA
AATCAATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAGAGG
CGAGACAAACACCCAACCAAGCAAAGCTTGAAGGTACAAATGACGCTC
GAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGA
TTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTGCT
GCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTGTAA
CTATTATGTTTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTGATTTTGT
CCAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGACATG
GGTAAGAGGTAGCGGGCAAAGCCCACAAACTCTAGGTAATGATCCTTCCG
CAGGTTACCTACGGAAGG.

>R3_ITS1_4 status=Passed nucl=519 crlStart=36 crlStop=519 crlLen=484
order=COL12-01YH
tctttccctaaagtttgccgctttgcccgtacCTCTTACCCATGTCT
TTTGAGTACTTACGTTTCCTCGGCGGGTCCGCCCGCGATTGGACAAAAT
CAAACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTACAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA
TGGGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA
ACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTC
ATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGC
GTGTAGACTCGCCTTAAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTGAGGC
GCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATAACGACGACGTCCAAAAGTACAT
TTTTACTCTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCGCTGAACTTAAGC
ATATCAATAAGCGGAGGAA.

>R3_ITS4_14 status=Passed nucl=521 crlStart=17 crlStop=521 crlLen=505
order=COL12-01YH
gggggggactaggggtATCTACTGATCCGAGGTCAGAGTGTA AAAATGTA
CTTTTGGACGTCGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCC
GAAATCAATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAGA
GGCGAGACAAACACCAACACCAAGCAAAGCTTGAAGGTACAAATGACGC
TCGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAA
GATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTCG
CTGCGTTCTTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGT
AACTATTATGTTTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTGATTTT
GTCCAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGACA
TGGGTAAGAGGTAGCGGGCAAAGCCCACAAACTCTAGGTAATGATCCTTC
CGCAGGTTACCTACGGAAGG.

>M1_ITS1_5 status=Passed nucl=518 crlStart=17 crlStop=518 crlLen=502
order=COL12-01YH
ggaattccttaagttgtGGGGGCTTTGCCCGCTACCTCTTACCCATGTCTT
TTGAGTACTTACGTTTCCTCGGCGGGTCCGCCCGCGATTGGACAAAATC
AAACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTACAAC
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT
GCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCA
TTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCG
TGTAGACTCGCCTTAAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTGAGCGG
CAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATAACGACGACGTCCAAAAGTACATT
TTTACTCTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCGCTGAACTTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGGAA.

>M1_ITS4_15 status=Passed nucl=521 crlStart=20 crlStop=521 crlLen=502
order=COL12-01YH
gggggggacggcgggatcctACCTGATCCGAGGTCAGAGTGTA AAAATGTA
CTTTTGGACGTCGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCC
GAAATCAATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAGA
GGCGAGACAAACACCAACACCAAGCAAAGCTTGAAGGTACAAATGACGC
TCGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAA
GATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTCG
CTGCGTTCTTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGT
AACTATTATGTTTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTGATTTT
GTCCAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGACA
TGGGTAAGAGGTAGCGGGCAAAGCCCACAAACTCTAGGTAATGATCCTTC
CGCAGGTTACCTACGGAAGG.

>M2_ITS1_6 status=Passed nucl=522 crlStart=15 crlStop=522 crlLen=508
order=COL12-01YH
gggcatcccctaataGTTTTGTTGGCTTTGCCCGCTACCTCTTACCCATG
TCTTTTGTAGTACTTACGTTTTCTCGGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGACAA
AATCAAACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTAC
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
TGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGC
GTCATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTC
TGCGTGTAGACTCGCCTTAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTTCGG
AGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATAACGACGACGTCCAAAAGTA
CATTTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTA
AGCATATCAATAAGCGGAGGAA.

>M2_ITS4_16 status=Passed nucl=517 crlStart=18 crlStop=517 crlLen=500
order=COL12-01YH
gtcaattacggatcctaCCTGATCCGAGGTCAGAGTGTA AAAATGTACTT
TTGGACGTCGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAA
ATCAATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAGAGGC
GAGACAAACACCCAACACCAAGCAAAGCTTGAAGGTACAAATGACGCTCG
AACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGAT
TCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTG
CGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAAC
TATTATGTTTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTGATTTTGT
CAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGACATGG
GTAAGAGGTAGCGGGCAAAGCCCAAACTCTAGGTAATGATCCTTCCGC
AGGTTACCTACGGAAG.

>Z1_ITS1_7 status=Failed nucl=521 crlStart=47 crlStop=521 crlLen=475
order=COL12-01YH
gaatttcttcaaccttgggtggggctttgcccgetacctcttaccctaTGTC
TTTTTGTAGTACTTACGTTTTCTCGGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGACAAA
ATCAAACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTACA
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT
GAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCG
TCATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCT
GCGTGTAGACTCGCCTTAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTTCGGA
GCGCAATACATCTCGCGCTTTGCACTCATAACGACGACGTCCAAAAGTAC
ATTTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA
GCATATCAATAAGCGGAGGAA.

>Z1_ITS4_17 status=Passed nucl=522 crlStart=18 crlStop=522 crlLen=505
order=COL12-01YH
aggggaaaacggggatcCTACTGATCCGAGGTCAGAGTGTA AAAATGT
ACTTTTGGACGTCGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTC
CGAAATCAATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAG
AGGCGAGACAAACACCCAACACCAAGCAAAGCTTGAAGGTACAAATGACG
CTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAA
AGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTC
GCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTG
TAACTATTATGTTTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTGATTT
TGTCCAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGAC
ATGGGTAAGAGGTAGCGGGCAAAGCCCAAACTCTAGGTAATGATCCTT
CCGCAGGTTACCTACGGAAGG.

>Z2_ITS1_9 status=Failed nucl=522 crlStart=36 crlStop=503 crlLen=468
order=COL12-01YH
tcccaggttgctttttattggtgggctttgcccgcTACCTCTTACCCATG
TCTTTTGGAGTACTTACGTTTTCTCGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGACAA
AATCAAACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTAC
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
TGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGC
GTCATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTC
TGCGTGTAGACTCGCCTTAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTTCGG
AGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATAACGACGACGTCCAAAAGTA
CATTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAAGGATACCCGCTGAACTTA
ATCatatcaataagcggaggaa.

>Z2_ITS4_19 status=Passed nucl=520 crlStart=27 crlStop=520 crlLen=494
order=COL12-01YH
gggggacaagggatcctacctgatcCGAGGTCAGAGTGTA AAAATGTAC
TTTTGGACGTCGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCG
AAATCAATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAGAG
GCGAGACAAACACCCAACACCAAGCAAAGCTTGAAGGTACAAATGACGCT
CGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG
ATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGC
TGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTA
ACTATTATGTTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTGATTTTG
TCCAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGACAT
GGGTAAGAGGTAGCGGGCAAAGCCCACAAACTCTAGGTAATGATCCTTCC
GCAGGTTACCTACGGAAGG

>Z3_ITS1_8 status=Passed nucl=522 crlStart=20 crlStop=522 crlLen=503
order=COL12-01YH
gaatttccccaaaaaatattGTGGGCTTTTGCCCGCTACCTCTTACCCATG
TCTTTTTGAGTACTTACGTTTTCTCGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGACA
AAATCAAACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTA
CAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT
TTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAG
CGTCATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCT
CTGCGTGTAGACTCGCCTTAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTTCG
GAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATAACGACGACGTCCAAAAGT
ACATTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTT
AAGCATATCAATAAGCGGAGGA

>Z3_ITS4_18 status=Passed nucl=520 crlStart=20 crlStop=520 crlLen=501
order=COL12-01YH
ggggggctgagggttccttACCTGATCGAGGTCAGAGTGTA AAAATGTAC
TTTTGGACGTCGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCG
AAATCAATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAGAG
GCGAGACAAACACCCAACACCAAGCAAAGCTTGAAGGTACAAATGACGCT
CGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG
ATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGC
TGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTA
ACTATTATGTTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTGATTTTG
TCCAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGACAT
GGGTAAGAGGTAGCGGGCAAAGCCCACAAACTCTAGGTAATGATCCTTCC
GCAGGTTACCTACGGAAGG.

>A1_ITS1_5 status=Passed nucl=515 crlStart=15 crlStop=515 crlLen=501
order=COL12-01SS 515 bp
GTCAAGTAAGTTTGTGGGCTTTGCCCGCTACCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACTTACG
TTTCCTCGGCGGGTCCGCCCGCGATTGGACAAAATCAAACCCTTTGCAGTTGCAATCAG
CGTCTGAAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTT
GTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCGCCT
TAAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACT
CATAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA
CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA.

>A1_ITS4_12 status=Passed nucl=518 crlStart=13 crlStop=518 crlLen=506
order=COL12-01SS 518 bp
TGGGACTACGTTCTACCTGATCCGAGGTCAAGAGTGTAAAAATGTACTTTTGGACGTCG
TCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATACGCCGGCTGCCAA
TTGTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAGAGGCGAGACAAACACCCAACACCAAGCAAAGCTT
GAAGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGC
GTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTG
CGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAACCTATTATGTTT
TTCAGGCGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTGATTTTGTCCAATCGGCGGGCGGACCCGC
CGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGACATGGGTAAGAGGTAGCGGGCAAAGCCCACAAACT
CTAGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCCCTACGGAAG.

>A2_ITS1_6 status=Passed nucl=516 crlStart=10 crlStop=516 crlLen=507
order=COL12-01SS 516 bp
TTTTGTTGTCCCTCGTGGGCTTTGCCCGCTACCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACTTAC
GTTTCCTCGGCGGGTCCGCCCGCGATTGGACAAAATCAAACCCTTTGCAGTTGCAATCA
GCGTCTGAAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATT
TGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCGCC
TTAAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCAC
TCATAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT
ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA.

>A2_ITS4_13 status=Passed nucl=516 crlStart=14 crlStop=516 crlLen=503
order=COL12-01SS 516 bp
GGGACAATGGTTCTACCTGATCCGAGGTGAGAGTGTAAAAATGTACTTTTGGACGTCGTC
GTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATACGCCGGCTGCCAATT
GTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAGAGGCGAGACAAACACCCAACACCAAGCAAAGCTTGA
AGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGT
TCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCG
TTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAACCTATTATGTTTTT
CAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTGATTTTGTCCAATCGGCGGGCGGACCCGCCG
AGGAAACGTAAGTACTCAAAGACATGGGTAAGAGGTAGCGGGCAAAGCCCACAAACTCT
AGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCCCTACGGAAGG.

>A3_ITS1_7 status=Passed nucl=518 crlStart=10 crlStop=518 crlLen=509
order=COL12-01SS 518 bp
TGGCCCCGGGACCGTTAGTGGGCTTTGCCCGCTACCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACTT
ACGTTTCCTCGGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGACAAAATCAAACCCTTTGCAGTTGCAAT
CAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC
GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCA
TTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCG
CCTTAAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTCCGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTCG
ACTCATAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGG
ATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA.

>A3_ITS4_14 status=Passed nucl=521 crlStart=14 crlStop=521 crlLen=508
order=COL12-01SS 521 bp
AGGGGAACAAAGACTCATACTGATCCGAGGTCAGAGTGTA AAAATGTACTTTTGGACGT
CGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATACGCCGGCTGCC
AATTGTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAGAGGCGAGACAAACACCCAACCAAGCAAAGC
TTGAAGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGT
GCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTCGC
TGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTGTA ACTATTATGT
TTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTGATTTTGTCCAATCGGCGGGCGGACCC
GCCGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGACATGGGTAAGAGGTAGCGGGCAAAGCCACAAA
CTCTAGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCCTACGGAAG.

>C1_ITS1_1 status=Passed nucl=515 crlStart=9 crlStop=515 crlLen=507
order=COL12-01SS 515 bp
GGCCAGTAGAGTTGTGGGCTTTGCCCGCTACCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACTTACG
TTTCCTCGGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGACAAAATCAAACCCTTTGCAGTTGCAATCAG
CGTCTGAAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTT
GTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCGCCT
TAAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTCCGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTCGACT
CATAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA
CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA.

>C1_ITS4_8 status=Passed nucl=520 crlStart=15 crlStop=520 crlLen=506
order=COL12-01SS 520 bp
AGGCAACATTGGTTCCTACCTGATCCGAGGTCAAGAGTGTA AAAATGTACTTTTGGACGT
CGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATACGCCGGCTGCC
AATTGTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAGAGGCGAGACAAACACCCAACCAAGCAAAGC
TTGAAGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGT
GCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTCGC
TGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTGTA ACTATTATGT
TTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTGATTTTGTCCAATCGGCGGGCGGACCC
GCCGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGACATGGGTAAGAGGTAGCGGGCAAAGCCACAAA
CTCTAGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCCCCTTACGGAAG.

>C2_ITS1_2 status=Passed nucl=516 crlStart=12 crlStop=516 crlLen=505
order=COL12-01SS 516 bp
CGCCAGTAGGGTTAATGGGCTTTGCCCGCTACCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACTTAC
GTTTCCTCGGCGGGTCCGCCCCGCGATTGGACAAAATCAAACCCTTTGCAGTTGCAATCA
GCGTCTGAAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATT
TGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCGCC
TTAAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCAC
TCATAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT
ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA.

>C2_ITS4_9 status=Passed nucl=518 crlStart=16 crlStop=518 crlLen=503
order=COL12-01SS 518 bp
TGGTACTACGGTTCCTACCTGATCGAGGTCAGAGTGTA AAAATGTACTTTTGGACGTGCGT
CGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATACGCCGGCTGCCAAT
TGTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAGAGGCGAGACAAACACCCAACCAAGCAAAGCTTG
AAGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCG
TTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGC
GTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTA ACTATTATGTTTT
TCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTTGATTTTTGTCCAATCGGCGGGCGGACCCGCC
GAGGAAACGTAAGTACTCAAAGACATGGGTAAGAGGTAGCGGGCAAAGCCCACAAACTC
TAGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCCCCCTACGGAAGG.

>C3_ITS1_3 status=Passed nucl=519 crlStart=15 crlStop=519 crlLen=505
order=COL12-01SS 519 bp
TCGGCGTTTTCACTGTAGTGGGCTTTGCCCGCTACCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACT
TACGTTTTCTCGGCGGGTCCGCCCCGCGATTGGACAAAATCAAACCCTTTGCAGTTGCAA
TCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTC
ATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTC
GCCTTAAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTG
CACTCATAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGG
GATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA.

>C3_ITS4_10 status=Passed nucl=519 crlStart=13 crlStop=519 crlLen=507
order=COL12-01SS 519 bp
TGGCGACAACGGTTCCTACCTGATCCGAGGTCAGAGTGTA AAAATGTACTTTTGGACGTGCG
TCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATACGCCGGCTGCCAA
TTGTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAGAGGCGAGACAAACACCCAACCAAGCAAAGCTT
GAAGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGC
GTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTG
CGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTA ACTATTATGTTTT
TTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTTGATTTTTGTCCAATCGGCGGGCGGACCCGC
CGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGACATGGGTAAGAGGTAGCGGGCAAAGCCCACAAACT
CTAGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCCCTACGGAAGG.

Annexe 12

Test de Newman-Keuls au seuil de 5% de l'indice de maladie sur plantules entières de *M. truncatula*

Première répétition biologique		
	A17^a	F83005.5^b
2 dpi	1,05 ^d ±0,22	0,7 ^d ±0,47
3 dpi	1,75 ^c ±0,71	0,9 ^d ±0,30
5 dpi	2,6 ^b ±0,59	1,75 ^c ±0,55
7 dpi	3,8 ^a ±0,41	1,9 ^b ±0,30

Deuxième répétition biologique		
	A17^a	F83005.5^b
2 dpi	1 ^d ±0	0,65 ^d ±0,48
3 dpi	1,8 ^c ±0,61	0,85 ^d ±0,48
5 dpi	2,5 ^b ±0,51	1,55 ^c ±0,75
7 dpi	3,65 ^a ±0,58	1,8 ^b ±0,52

Troisième répétition biologique		
	A17^a	F83005.5^b
2 dpi	0,9±0,30	0,75±0,44
3 dpi	1,7±0,65	0,9±0,30
4 dpi	2,75±0,63	1,9±0,30
5 dpi	3,65±0,81	1,95±0,22

Annexe 13

Analyse de variance de l'indice d'attaque sur feuilles détachées de *M. truncatula*

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Lignée	76,544	1	76,544	82,10	0
Répétition	1,172	2	0,586	0,63	0,53912
Temps	509,695	4	127,424	136,67	0
Lignée x Répétition	0,172	2	0,086	0,09	0,91135
Lignée x Temps	27,317	4	6,829	7,32	0,00002
Répétition x Temps	1,522	8	0,19	0,20	0,98909
Lignée x Répétition x Temps	5,633	8	0,704	0,75	0,64402
Erreur	307,667	330	0,932		

Test de Newman-Keuls au seuil de 5% de l'indice de maladie sur feuilles détachées

	F1 = A17	F2 =F83005.5
4 dpi	1 ^f	1 ^f
8 dpi	2,72 ^d	2,14 ^e
12 dpi12	4,22 ^b	2,81 ^d
16 dpi16	4,5 ^b	3,28 ^c
20 dpi	5 ^a	3,61 ^c

Moyennes inter F1xF2xF3= Lignée x Répétition biologique x temps						
	F1 = A17			F2 =F83005.5^b		
	3,48 ^a			2,57 ^b		
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep1	Rep2	Rep3
4 dpi	1±0	1±0	1±0	1±0	1±0	1±0
8 dpi	2,5±1,38	3,17±1,12	2,5±1,38	2,33±1,07	1,83±0,58	2,25±0,75
12 dpi12	4,25±1,36	4,17±1,34	4,25±1,36	2,75±1,35	2,83±0,84	2,83±1,33
16 dpi16	4,42±1,08	4,67±0,65	4,42±1,08	3,17±1,19	3,58±1,08	3,08±1,34
20 dpi	5±0	5±0	5±0	3,5±1,08	3,83±1,33	3,5±1,08

Annexe 14

Analyse de variance du nombre de pycnides sur les lignées de *M. truncatula*

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F
Lignée	643934,4	11	58539,49	145,696**
Temps	576008,5	4	144002,1	358,399**
Lignée x Temps	242865,1	44	5519,662	13,738**
Erreur	265183,6	660	401,793	

Test de Newman-Keuls (5%) pour le nombre de pycnides sur feuilles détachées de *M. truncatula*

	A17	F83005.5	ILC 1929
Répétition biologique 1	36,85 ^b	11,60 ^c	85,93 ^a
Répétition biologique 2	35,53 ^b	12,32 ^c	50,13 ^a
Répétition biologique 3	36,07 ^b	12,82 ^c	86,05 ^a
Répétition biologique 4	36,73 ^b	12,87 ^c	84,83 ^a

Annexe 15

Analyse de variance de l'expression des gènes

Gène PR1

Facteur 1= Gène, Facteur 2= lignées, Facteur 3= traitement ; Facteur 4= Temps

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Gène	5571,27	1	5571,26	64767,2	
Lignée	5,573	1	5,57	64,78	0
Traitement	2,456	1	2,456	28,54	0
Temps	11,22	3	3,739	43,47	0
Gene x lignée	19,17	1	19,167	222,81	0
Gène x traitement	0,317	1	0,317	3,68	0
Gène x Temps	37,22	3	12,40	144,22	0,00537
Lignée x traitement	4,23	1	4,23	49,17	0
Lignée x temps	13,89	3	4,631	53,84	0
Traitement x temps	6,095	3	2,032	23,62	0
Var. F1*2*3	0,012	1	0,012	0,14	0
Var. F1*2*4	10,36	3	3,454	40,15	0,70827
Var. F1*3*4	6,59	3	2,197	25,54	0
Var. F2*3*4	3,16	3	1,054	12,25	0
Var. F1*2*3*4	0,103	3	0,034	0,40	0
Erreur	13,76	160	0,086		

Test de Newman-Keuls au seuil de 5 %

F2 F4	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes			
2.0 4.0	F83005- 3 dpi	26,689	A			
2.0 3.0	F83005- 2 dpi	26,35		B		
2.0 1.0	F83005- 0 dpi	25,909			C	
1.0 1.0	A17- 0 dpi	25,906			C	
1.0 3.0	A17- 2 dpi	25,757			C	D
1.0 2.0	A17- 1 dpi	25,672				D
1.0 4.0	A17- 3 dpi	25,607				D
2.0 2.0	F83005- 1 dpi	25,357				E

Gène PR5

Facteur 1= Gène, Facteur 2= lignées, Facteur 3= traitement ; Facteur 4= Temps

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var. Totale	1827,288	191	9,567		
Var. Facteur 1	1132,413	1	1132,413	23383,26	0
Var. Facteur 2	20,583	1	20,583	425,025	0
Var. Facteur 3	2,428	1	2,428	50,135	0
Var. Facteur 4	56,855	3	18,952	391,336	0
Var. F1*2	166,642	1	166,642	3441,003	0
Var. F1*3	0,017	1	0,017	0,348	0,56351
Var. F1*4	299,519	3	99,84	2061,594	0
Var. F2*3	3,709	1	3,709	76,595	0
Var. F2*4	25,406	3	8,469	174,867	0
Var. F3*4	7,246	3	2,415	49,872	0
Var. F1*2*3	0,219	1	0,219	4,525	0,03302
Var. F1*2*4	69,755	3	23,252	480,129	0
Var. F1*3*4	5,346	3	1,782	36,795	0
Var. F2*3*4	26,031	3	8,677	179,169	0
Var. F1*2*3*4	3,371	3	1,124	23,202	0
Erreur	7,749	160	0,048		

Test de Newman-Keuls au seuil de 5 %

F2 F4	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes					
2.0 1.0	F83005.5- 0 dpi	25,049	A					
1.0 1.0	A17- 0 dpi	25,018	A					
2.0 4.0	F83005.5- 3 dpi	24,553		B				
2.0 3.0	F83005.5- 2 dpi	24,391			C			
1.0 2.0	A17- 1 dpi	24,144				D		
2.0 2.0	F83005- 1 dpi	24,126				D		
1.0 4.0	A17- 3 dpi	23,717					E	
1.0 3.0	A17- 2 dpi	22,621						F

Gène PR10

Facteur 1= Gène, Facteur 2= lignées, Facteur 3= traitement ; Facteur 4= Temps

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var. Totale	1008,029	191	5,278		
Var. Facteur 1	392,162	1	392,162	10021,13	0
Var. Facteur 2	1,027	1	1,027	26,232	0
Var. Facteur 3	2,292	1	2,292	58,558	0
Var. Facteur 4	190,976	3	63,659	1626,71	0
Var. F1*2	32,775	1	32,775	837,515	0
Var. F1*3	6,308	1	6,308	161,184	0
Var. F1*4	323,925	3	107,975	2759,149	0
Var. F2*3	11,751	1	11,751	300,283	0
Var. F2*4	0,357	3	0,119	3,039	0,03032
Var. F3*4	16,001	3	5,334	136,297	0
Var. F1*2*3	1,629	1	1,629	41,632	0
Var. F1*2*4	13,229	3	4,41	112,685	0
Var. F1*3*4	3,107	3	1,036	26,465	0
Var. F2*3*4	4,668	3	1,556	39,764	0
Var. F1*2*3*4	1,561	3	0,52	13,299	0
Erreur	6,261	160	0,039		

Test de Newman-Keuls au seuil de 5 %

F2 F4	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes						
2.0 1.0	F83005.5- 0 dpi	23,559	A						
1.0 1.0	A17- 0 dpi	23,552	A						
2.0 4.0	F83005.5- 3 dpi	22,017		B					
1.0 4.0	A17- 3dpi	21,81			C				
2.0 3.0	F83005.5- 2 dpi	21,558				D			
1.0 3.0	A17- 2dpi	21,331					E		
2.0 2.0	F83005.5- 1 dpi	20,953						F	
1.0 2.0	A17- 1dpi	20,808							G

Gène Pi20

Facteur 1= Gène, Facteur 2= lignées, Facteur 3= traitement ; Facteur 4= Temps

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var. Totale	5308,934	191	27,795		
Var. Facteur 1	3582,975	1	3582,975	60459,81	0
Var. Facteur 2	692,743	1	692,743	11689,48	0
Var. Facteur 3	3,76	1	3,76	63,443	0
Var. Facteur 4	304,705	3	101,568	1713,882	0
Var. F1*2	74,641	1	74,641	1259,5	0
Var. F1*3	2,043	1	2,043	34,478	0
Var. F1*4	153,555	3	51,185	863,707	0
Var. F2*3	8,669	1	8,669	146,282	0
Var. F2*4	289,133	3	96,378	1626,296	0
Var. F3*4	111,373	3	37,124	626,441	0
Var. F1*2*3	1,341	1	1,341	22,621	0,00001
Var. F1*2*4	18,69	3	6,23	105,127	0
Var. F1*3*4	9,633	3	3,211	54,181	0
Var. F2*3*4	39,516	3	13,172	222,265	0
Var. F1*2*3*4	6,677	3	2,226	37,556	0
Erreur	9,482	160	0,059		

Test de Newman-Keuls au seuil de 5 %

F2 F4	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes						
2.0 3.0	F83005.5- 2 dpi	30,946	A						
2.0 4.0	F83005.5-3 dpi	30,273		B					
2.0 2.0	F83005.5-1 dpi	29,148			C				
1.0 2.0	A17-1dpi	25,598				D			
1.0 3.0	A17-2 dpi	25,168					E		
1.0 1.0	A17-0 dpi	24,803						F	
2.0 1.0	F83005.5- 0 dpi	24,686						F	
1.0 4.0	A17-3 dpi	24,287							G

Gène PAL

Facteur 1= Gène, Facteur 2= lignées, Facteur 3= traitement ; Facteur 4= Temps

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var. Totale	4491,142	191	23,514		
Var. Facteur 1	4332,454	1	4332,454	95202,43	0
Var. Facteur 2	11,739	1	11,739	257,951	0
Var. Facteur 3	0,009	1	0,009	0,204	0,65674
Var. Facteur 4	44,723	3	14,908	327,586	0
Var. F1*2	10,972	1	10,972	241,094	0
Var. F1*3	0,786	1	0,786	17,264	0,00009
Var. F1*4	23,968	3	7,989	175,562	0
Var. F2*3	3,144	1	3,144	69,088	0
Var. F2*4	19,55	3	6,517	143,201	0
Var. F3*4	11,907	3	3,969	87,217	0
Var. F1*2*3	0,141	1	0,141	3,09	0,07691
Var. F1*2*4	15,854	3	5,285	116,13	0
Var. F1*3*4	1,708	3	0,569	12,507	0
Var. F2*3*4	5,588	3	1,863	40,933	0
Var. F1*2*3*4	1,317	3	0,439	9,649	0,00001
Erreur	7,281	160	0,046		

Test de Newman-Keuls au seuil de 5 %

F2 F4	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes						
2.0 4.0	F83005.5- 3 dpi	26,395	A						
2.0 3.0	F83005.5- 2 dpi	25,879		B					
1.0 4.0	A17- 3 dpi	25,613			C				
1.0 2.0	A17- 1 dpi	25,344				D			
2.0 2.0	F83005.5- 1 dpi	25,143					E		
1.0 1.0	A17- 0 dpi	24,651						F	
2.0 1.0	F83005.5- 0 dpi	24,65						F	
1.0 3.0	A17- 2 dpi	24,48							G

Gène de la Flavonne synthase

Facteur 1= Gène, Facteur 2= lignées, Facteur 3= traitement ; Facteur 4= Temps

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var. Totale	15463,01	191	80,958		
Var. Facteur 1	15253,54	1	15253,54	377913,2	0
Var. Facteur 2	55,454	1	55,454	1373,9	0
Var. Facteur 3	0	1	0	0	0,99
Var. Facteur 4	2,811	3	0,937	23,211	0
Var. F1*2	0,123	1	0,123	3,049	0,07891
Var. F1*3	0,365	1	0,365	9,049	0,00319
Var. F1*4	93,737	3	31,246	774,128	0
Var. F2*3	5,221	1	5,221	129,345	0
Var. F2*4	20,943	3	6,981	172,96	0
Var. F3*4	13,253	3	4,418	109,449	0
Var. F1*2*3	0,126	1	0,126	3,121	0,07545
Var. F1*2*4	5,07	3	1,69	41,873	0
Var. F1*3*4	0,525	3	0,175	4,339	0,00586
Var. F2*3*4	4,817	3	1,606	39,784	0
Var. F1*2*3*4	0,572	3	0,191	4,726	0,00362
Erreur	6,458	160	0,04		

Test de Newman-Keuls au seuil de 5 %

F2 F4	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes					
2.0 3.0	F83005.5 -2 dpi	30,406	A					
2.0 4.0	F83005.5- 3 dpi	30,049		B				
2.0 2.0	F83005.5- 1 dpi	29,865			C			
2.0 1.0	F83005.5- 0 dpi	29,622				D		
1.0 1.0	A17- 0 dpi	29,598				D		
1.0 2.0	A17- 1 dpi	28,825					E	
1.0 3.0	A17- 2 dpi	28,631						F
1.0 4.0	A17- 3 dpi	28,589						F

Gène de la Chorismate synthase

Facteur 1= Gène, Facteur 2= lignées, Facteur 3= traitement ; Facteur 4= Temps

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.Totale	2900,081	191	15,184		
Var.Facteur 1	561,138	1	561,138	7499,69	0
Var.Facteur 2	1155,655	1	1155,655	15445,5	0
Var.Facteur 3	0,731	1	0,731	9,766	0,00227
Var.Facteur 4	37,854	3	12,618	168,64	0
Var. F1*2	0,221	1	0,221	2,955	0,08364
Var. F1*3	4,206	1	4,206	56,21	0
Var. F1*4	703,539	3	234,513	3134,29	0
Var. F2*3	3,172	1	3,172	42,40	0
Var. F2*4	404,507	3	134,836	1802,10	0
Var. F3*4	6,157	3	2,052	27,43	0
Var. F1*2*3	0,031	1	0,031	0,41	0,53057
Var. F1*2*4	0,265	3	0,088	1,18	0,3184
Var. F1*3*4	1,665	3	0,555	7,42	0,00014
Var. F2*3*4	6,224	3	2,075	27,73	0
Var. F1*2*3*4	2,745	3	0,915	12,23	0
Erreur	11,971	160	0,075		

Test de Newman et Keuls au seuil de 5 %

F2 F4	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes						
2.0 2.0	F83005.5- 1 dpi	27,642	A						
2.0 4.0	F83005.5- 3 dpi	27,397		B					
2.0 3.0	F83005.5- 2 dpi	26,749			C				
2.0 1.0	F83005.5- 0 dpi	24,903				D			
1.0 1.0	A17- 0 dpi	24,876				D			
1.0 4.0	A17- 3 dpi	21,305					E		
1.0 3.0	A17- 2 dpi	20,907						F	
1.0 2.0	A17- 1 dpi	19,975							G

Gène de la chitinase

Facteur 1= Gène, Facteur 2= lignées, Facteur 3= traitement ; Facteur 4= Temps

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var. Totale	2678,941	191	14,026		
Var. Facteur 1	1716,585	1	1716,585	30801,15	0
Var. Facteur 2	6,621	1	6,621	118,809	0
Var. Facteur 3	0,583	1	0,583	10,457	0,00165
Var. Facteur 4	359,596	3	119,865	2150,777	0
Var. F1*2	17,953	1	17,953	322,127	0
Var. F1*3	0,028	1	0,028	0,51	0,4829
Var. F1*4	526,853	3	175,618	3151,157	0
Var. F2*3	4,287	1	4,287	76,929	0
Var. F2*4	2,695	3	0,898	16,121	0
Var. F3*4	9,595	3	3,198	57,39	0
Var. F1*2*3	0,017	1	0,017	0,311	0,58487
Var. F1*2*4	10,858	3	3,619	64,94	0
Var. F1*3*4	2,05	3	0,683	12,262	0
Var. F2*3*4	6,616	3	2,205	39,572	0
Var. F1*2*3*4	5,686	3	1,895	34,006	0
Erreur	8,917	160	0,056		

Test de Newman-Keuls au seuil de 5 %

F2 F4	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes					
2.0 1.0	F83005.5- 0 dpi	25,731	A					
1.0 1.0	A17- 0 dpi	25,707	A					
2.0 4.0	F83005.5- 3 dpi	23,677		B				
1.0 4.0	A17- 3 dpi	23,265			C			
2.0 3.0	F83005.5- 2 dpi	22,913				D		
1.0 3.0	A17- 2 dpi	22,555					E	
2.0 2.0	F83005.5- 1 dpi	22,438					E	
1.0 2.0	A17- 1 dpi	21,747						F

Gène β -1,3-Glucanase

Facteur 1= Gène, Facteur 2= lignées, Facteur 3= traitement ; Facteur 4= Temps

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var. Totale	3506,465	191	18,358		
Var. Facteur 1	3247,488	1	3247,488	62907,12	0
Var. Facteur 2	2,853	1	2,853	55,257	0
Var. Facteur 3	2,177	1	2,177	42,161	0
Var. Facteur 4	66,939	3	22,313	432,227	0
Var. F1*2	29,11	1	29,11	563,897	0
Var. F1*3	0,653	1	0,653	12,651	0,00062
Var. F1*4	45,937	3	15,312	296,615	0
Var. F2*3	7,043	1	7,043	136,429	0
Var. F2*4	23,526	3	7,842	151,908	0
Var. F3*4	15,139	3	5,046	97,754	0
Var. F1*2*3	0	1	0	0	0,99
Var. F1*2*4	39,655	3	13,218	256,051	0
Var. F1*3*4	4,534	3	1,511	29,279	0
Var. F2*3*4	12,052	3	4,017	77,818	0
Var. F1*2*3*4	1,1	3	0,367	7,1	0,00021
Erreur	8,26	160	0,052		

Test de Newman-Keuls au seuil de 5 %

F2x F4	Libellés	Moyennes	Groupes homogènes					
1.0 2.0	A17-1 dpi	27,63	A					
2.0 2.0	F83005.5- 1 dpi	27,362		B				
1.0 4.0	A17- 3 dpi	27,148			C			
2.0 3.0	F83005.5- 2 dpi	27,005				D		
2.0 4.0	F83005.5- 3 dpi	26,924				D		
2.0 1.0	F83005.5- 0 dpi	26,025					E	
1.0 1.0	A17- 0 dpi	25,997					E	
1.0 3.0	A17- 2 dpi	25,564						F