



UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

## THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

**Filière :** Sciences Agronomiques

**Option :** Protection des végétaux

Présentée par :

**M<sup>me</sup>. REKAD Fatma Zohra**

Thème

**Caractérisation phénotypique et génotypique d'isolats  
de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, agent  
causal du mildiou de la pomme de terre et de la tomate  
dans la région du nord-ouest d'Algérie**

Soutenue le : 01 Juillet 2018

Devant le jury :

M. YUCEF-BENKADA M.	Prof. Président	Université de Mostaganem
M. KIHAL M.	Prof. Examineur	Université d'Oran
M. SETTI B.	MCA Examineur	Université de Chlef
M. BOUZNAD Z.	Prof. Directeur de thèse	E.N.S.A. Alger
M <sup>me</sup> . GUENAOUI Y.	Prof. Co-Directrice de thèse	Université de Mostaganem

**Année universitaire : 2017/2018**

## REMERCIEMENTS

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à Madame Guenaoui Yamina, Professeur à l'Université de Mostaganem, co-directrice de ma thèse de m'avoir encadrée. Sa disponibilité, son aide précieuse, ses encouragements et son soutien tout au long de ce travail ont été d'un immense réconfort.

Je remercie Monsieur Bouznad Zouaoui, Professeur à l'ENSA d'Alger d'avoir accepté d'être mon encadreur. J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur Youcef-Benkada Mokhtar, Professeur à l'Université de Mostaganem de m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Je tiens à remercier également les autres membres de jury, Messieurs Kihal Mabrouk et Setti Benali d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Je remercie chaleureusement M<sup>me</sup>. Santa Olga Cacciola de m'avoir accueillie dans le laboratoire de pathologie végétale de l'Université de Catania, Italie. Merci également à Maria Evoli, Ivana Puglisi et à toute l'équipe de m'avoir aidée durant les stages que j'ai effectués à l'Université de Catania. Je remercie du fond du cœur M. David Cooke de l'Institut James Hutton, Ecosse, pour son aide et ses pertinents conseils lors des discussions sur la partie moléculaire. Je remercie également mes collègues, Labdaoui M. et Bouazza I. thésards à l'Université de Mostaganem et mes amies Haddadi Yasmina et Bendjilali Nadia de L'INPV pour leur aide et leurs encouragements.

Enfin, j'adresse un remerciement tout particulier à M. Touati Fatah, mon conjoint, pour son aide dans l'analyse statistique et l'utilisation des différents logiciels. Je le remercie pour sa patience et son soutien sans faille dans les moments difficiles. Je remercie ma chère Mère, mes sœurs et mes frères pour leur soutien et leurs encouragements durant la réalisation de cette thèse.

Et pour finir je dédie ce modeste travail à la mémoire de mon cher Père ainsi qu'à toute ma famille surtout mon petit prince Amir.

## Abstract

Late blight caused by *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary is the most serious disease of potato worldwide. In Algeria the disease is very common on potato, but has also been reported on tomato in some areas of the country. In 2007-2008 the disease has reached epidemic proportions in all potato-growing regions of the north west of Algeria where the weather conditions were favourable. Consequently, heavy yield losses were recorded in these regions. In order to understand the population of pathogen in the northwestern of Algeria, an emerging potato production region, a total of 161 *P. infestans* isolates collected on potato and tomato from 2008 to 2014 were characterized for the mating type, aggressiveness, the level of metalaxyl sensitivity (n=97) and their genotypic diversity with microsatellite markers (n=137).

A mating type assay showed that 111 isolates were A2 mating type and 50 were A1 mating type. Significant differences in aggressiveness were found among tested isolates. Cultivar Sarpo Mira appeared more resistant than Spunta and tomato cultivar Agora. A high percentage of resistance to metalaxyl among isolates was detected. Metalaxyl resistant phenotype was present among the two mating type with higher percentage among A2 mating type isolates. SSR analysis of *P. infestans* population showed low genotypic diversity. The genotype 13\_A2 was the predominant in the population with a frequency of 67% followed by 2\_A1 (21%) and 23\_A1 (5%).

**Keywords:** *Phytophthora infestans*, potato, tomato, mating type, aggressiveness, metalaxyl, microsatellite markers

## Résumé

Le mildiou causé par l'oomycète *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary est la maladie la plus redoutable sur pomme de terre à travers le monde. En Algérie, La maladie est très fréquente sur pomme de terre et existe aussi sur tomate. Durant la période 2007-2008, le mildiou a provoqué de graves dégâts sur ces deux cultures dans le nord-ouest algérien. Afin de comprendre la structure des populations de *P. infestans* dans cette région stratégique, 161 isolats collectés de pomme de terre et de tomate durant la période 2008-2014 ont été caractérisés pour le type sexuel, la résistance au métalaxyl (n=97), un fongicide largement utilisé en Algérie et l'agressivité sur différentes variétés. L'étude de la diversité génotypique des isolats (n=137) a été réalisée par l'utilisation des marqueurs microsatellites.

Le test de type sexuel a révélé que 111 isolats sont de type sexuel A2 et 50 de Type A1. Une différence significative d'agressivité a été trouvée chez les isolats testés. La variété de pomme de terre Sarpo Mira s'est montrée très résistante par rapport à Spunta et à la variété de tomate Agora. Une fréquence très élevée d'isolats résistants au métalaxyl a été détectée. Le phénotype résistant a été trouvé chez les deux types sexuels avec un taux très élevé chez les isolats de type A2. L'analyse par SSR a révélé une faible diversité génétique dans la population de *P. infestans* de cette région. Le génotype 13\_A2 a été le plus dominant dans la population avec une fréquence de 67% suivi par les génotypes, 2\_A1 (21%) et 23\_A1 (5%).

### Mots clés :

*Phytophthora infestans*, pomme de terre, tomate, type sexuel, agressivité, métalaxyl, marqueurs microsatellite

## ملخص

يعتبر البياض الزغبي الذي يسببه العامل الممرض *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary من أخطر الأمراض التي تصيب البطاطس و الطماطم و الأكثرها إنتشارا في العالم. خلال سنة 2007 - 2008 ، سجلت أضرار كبيرة على محاصيل البطاطس خاصة في منطقة شمال غرب الجزائر نتيجة للظروف المناخية الملائمة التي ساعدت على إنتشار واسع لهذا المرض ذو الطابع الوبائي.

من أجل وضع إستراتيجية لمكافحة هذا المرض، من الضروري معرفة خصائص فصائل العامل الممرض المتواجدة بالجزائر. خلال هذه الدراسة تمت معاينة فصائل معزولة من محاصيل البطاطس و الطماطم في منطقة شمال غرب الجزائر خلال الفترة الممتدة من 2008-2014 وذلك من أجل معرفة خصائصها في ما يخص نوع الجنس، القدرة على إحداث المرض على صنفين من البطاطس (Sarpa Mira و Spunta) و صنف من الطماطم (Agora) ، المقاومة للمبيد métalaxyl، الأكثر إستعمالا ضد البياض الزغبي في الجزائر. أما الدراسة الوراثية للعزلات تمت بإستعمال تقنية الواسمات الوراثية SSR.

أكدت هذه الدراسة إنتشار كبير للعزلات من النوع الجنسي A2 (111/161) والذي تميز بالمقاومة للمبيد métalaxyl. أظهرت دراسة القدرة على إحداث المرض لبعض العزلات على صنفين من البطاطس و صنف من الطماطم بأن الصنفين Spunta وAgora، أكثر حساسية من الصنف Sarpo Mira، الذي أظهر مقاومة معتدلة. بينت الدراسة الوراثية للعزلات إنتشار كبير للنوع الوراثي 13-A2 (67%) متنوع بالنوعين 2-A1 (21%) و 23-A1 (5%) .

**كلمات مفتاحية :** *Phytophthora infestans* ، بطاطس، طماطم، نوع الجنس، القدرة على إحداث المرض، المقاومة للمبيد métalaxyl ، الواسمات الوراثية SSR

# TABLE DES MATIERES

Remerciements.....	i
Abstract.....	ii
Résumé.....	iii
ملخص.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	xi
Acronymes .....	xii
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>1</b>

## CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I-1 Généralités sur la pomme de terre et la tomate .....</b>	<b>3</b>
I-1.1 La pomme de terre .....	3
I-1.1.1 Importance économique dans le monde.....	3
I-1.1.2 Culture de la pomme de terre en Algérie .....	3
I-1.2 La tomate .....	5
I-1.2.1 Importance économique dans le monde.....	5
I-1.2.2 Culture de la tomate en Algérie .....	6
<b>I-2 Maladie du mildiou .....</b>	<b>7</b>
I-2.1 Importance et origine .....	7
I-2.2 Symptômes de la maladie .....	9
I-2.2.1 Symptômes sur pomme de terre.....	9
I-2.2.2. Symptômes sur tomate.....	10
I-2.3 Méthodes de lutte.....	11
I-2.3.1 Lutte prophylactique .....	11
I-2.3.2 Lutte chimique .....	11
I-2.3.3 Lutte génétique.....	12
<b>I-3 L'agent pathogène .....</b>	<b>12</b>
I-3.1 Taxonomie .....	12
I-3.2 Description morphologique .....	13
I-3.3 Gamme d'hôtes.....	13
I-3.4 Cycle de vie et épidémiologie.....	14
I-3.4.1 Conservation hivernale du parasite et formation d'inoculum primaire .....	14
I-3.4.2 Développement au champ et contamination des tubercules .....	15
<b>I-4. L'influence de certains facteurs sur la croissance mycélienne et la sporulation chez <i>Phytophthora infestans</i>.....</b>	<b>15</b>
I-4.1. Les exigences trophiques .....	16

I-4.2. Les facteurs climatiques.....	17
<b>I-5 Marqueurs utilisés pour la caractérisation des populations de <i>P. infestans</i> .....</b>	<b>17</b>
I-5.1 Variabilité phénotypique.....	17
I-5.1.1 Type sexuel .....	17
I-5.1.2 Résistance de l'hôte et pouvoir pathogène des parasites .....	18
I-5.1.3 Résistance au métalaxyl.....	20
I-5.2 Variabilité moléculaire.....	21
I-5.2.1 Les marqueurs moléculaires utilisés pour la caractérisation génotypique de <i>P. infestans</i> .....	23

## CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

<b>II-1 Présentation des sites d'échantillonnage.....</b>	<b>25</b>
<b>II-2 Echantillonnage et isolement de l'agent pathogène.....</b>	<b>26</b>
II-2.1 Méthode d'échantillonnage .....	26
II-2.2 Technique d'isolement .....	26
<b>II-3 Matériel végétal .....</b>	<b>26</b>
II-3.1 Origine et utilisation des plants .....	26
II-3.2 Culture en serre.....	27
II-3.3 Prélèvements des folioles .....	27
<b>II-4 Caractérisation phénotypique .....</b>	<b>28</b>
II-4.1 Détermination du type sexuel.....	29
II-4.2 Tests de l'effet de quelques facteurs sur la croissance mycélienne et la sporulation de <i>P. infestans</i> .....	30
II-4.2.1 Test de l'effet de milieu de culture.....	30
II-4.2.2 Test de l'effet de la lumière et de l'obscurité .....	31
II-4.2.3 Test de l'effet de la température sur la croissance mycélienne .....	31
II-4.3 Test d'agressivité des isolats sur folioles détachées .....	31
II-4.3 Test de résistance au métalaxyl.....	35
<b>II.5 Etude de la diversité génétique des isolats de <i>P. infestans</i> par les marqueurs microsatellites .....</b>	<b>36</b>
II.5.1 Obtention du mycélium.....	37
II.5.2 Extraction d'ADN .....	37
II.5.3 Amplification des microsatellites .....	39
II.5.4 Analyses des données .....	40

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

<b>III-1 Résultats.....</b>	<b>41</b>
III-1.1 Isolement et identification de l'agent pathogène.....	41
III-1.2 Détermination du type sexuel.....	42
III-1.3 Effet de quelques facteurs sur la croissance mycélienne et la sporulation des isolats .....	43
III-1.3.1 L'effet de milieu de culture .....	43

III-1.3.2 L'effet de la lumière et de l'obscurité .....	47
III-1.3.3 L'effet de la température sur la croissance mycélienne .....	50
III-1.4 Test de résistance des isolats au métalaxyl .....	52
III-1.5 Test d'agressivité des isolats sur les différentes variétés .....	54
III-1.6 Caractérisation génotypique.....	59
<b>III-2 Discussions .....</b>	<b>65</b>
III-2.1 Type sexuel .....	65
III-2.2 Effet de facteurs physicochimiques sur le développement de <i>P. infestans</i> .....	67
III-2.3 Test d'agressivité des isolats sur les différentes variétés .....	67
III-2.4 Résistance des isolats au métalaxyl.....	68
III-2.5 Caractérisation génotypique des isolats .....	69
<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>72</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>74</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>85</b>

## Liste des figures

- Fig. 1 :** Répartition de la production mondiale de pomme de terre par continent
- Fig. 2 :** Evolution de la production de pomme de terre en Algérie 2007-2014
- Fig. 3 :** Répartition de la production mondiale de tomate en 2014
- Fig. 4 :** Evolution des superficies et de la production de tomate en Algérie durant la période 2007-2014
- Fig. 5 :** Chemins suggérés de migration des anciennes lignées de *Phytophthora infestans* à travers le monde
- Fig. 6 :** Symptômes de mildiou sur feuilles, tiges et tubercule de pomme de terre
- Fig. 7 :** Symptômes de mildiou sur feuilles, tige et fruit de la tomate
- Fig. 8 :** Cycle de développement de *Phytophthora infestans*
- Fig. 9 :** Répartition spatiale des différents génotypes de *Phytophthora infestans* identifiés en Europe durant 2014
- Fig. 10 :** Répartition des sites d'échantillonnage dans la zone d'étude
- Fig. 11 :** Culture sous serre des variétés de pomme de terre, Spunta et Sarpo Mira
- Fig. 12 :** Culture sous serre de la variété de tomate Agora
- Fig. 13 :** Test de confrontation d'un isolat de *Phytophthora infestans* inconnu pour le type sexuel avec une souche de référence de type A1
- Fig. 14 :** Un isolat de *P. infestans* repiqué sur deux milieux de cultures.
- Fig. 15 :** Etapes de la préparation des suspensions sporales des isolats de *P. infestans*
- Fig. 16 :** Inoculation de la face inférieure des folioles des trois variétés testées
- Fig. 17 :** Disques foliaires inoculés chacun avec une goutte de 20  $\mu$ l de la suspension de sporanges
- Fig. 18 :** Principales étapes d'extraction de l'ADN génomique des isolats de *Phytophthora infestans* selon le protocole du kit Power Plant Pro DNA Isolation utilisé
- Fig. 19 :** Aspect des cultures de quelques isolats de *Phytophthora infestans*
- Fig. 20 :** Fréquences des deux types sexuels, A1 et A2 dans le nord-ouest algérien durant la période 2008-2014

- Fig. 21** : Fréquences des deux types sexuels (A1, A2) dans les populations de *Phytophthora infestans* collectée de deux régions (Mostaganem et Ain Defla) dans le nord-ouest algérien
- Fig. 22** : Culture mycélienne d'un isolat de *Phytophthora infestans* sur deux milieux de cultures
- Fig. 23** : Croissance mycélienne des isolats de *Phytophthora infestans* sur deux milieux de cultures, petit pois (PP) et pois chiche (PCH) après 10 jours d'incubation à 20°C
- Fig. 24** : Sporulation des isolats de *Phytophthora infestans* sur deux milieux de culture, petit pois et pois chiche après 10 jours d'incubation à 20°C
- Fig. 25** : Croissance mycélienne des différents isolats à la lumière (PPL) et à l'obscurité (PPO) après 10 jours d'incubation à 20°C
- Fig. 26** : Sporulation des différents isolats après 10 jours d'incubation à lumière et à l'obscurité
- Fig. 27** : Croissance mycélienne des isolats de *Phytophthora infestans* après 10 jours d'incubation à différentes températures
- Fig. 28** : Résultats du test de résistance au métalaxyl de 3 isolats de *Phytophthora infestans*
- Fig. 29** : Résistance au métalaxyl des isolats de *Phytophthora infestans* dans la région nord-ouest d'Algérie pour la période 2008-2014
- Fig. 30** : Résistance au métalaxyl des isolats de *Phytophthora infestans* par rapport au type sexuel
- Fig. 31** : Résistance au métalaxyl des isolats de *Phytophthora infestans* collectés dans deux région, Mostaganem et Ain Déflua
- Fig. 32** : Diversité des lésions causées par un isolat issu de pomme de terre sur les folioles des 3 variétés testées
- Fig. 33** : Diversité des lésions causées par un isolat issu de tomate sur les folioles des 3 variétés testées
- Fig. 34** : Taille des lésions provoquées par les isolats de *Phytophthora infestans* testées sur les différentes variétés
- Fig. 35** : Sporulation par lésions provoquées par les isolats de *Phytophthora infestans* sur les variétés Testées
- Fig. 36** : Capacité de sporulation des isolats de *Phytophthora infestans* testées sur les trois variétés
- Fig. 37** : Fréquence de génotypes des isolats de *Phytophthora infestans* collectés dans la région du Nord-Ouest d'Algérie durant 2008-2014
- Fig. 38** : Fréquence de génotypes des isolats de *Phytophthora infestans* collectés dans deux régions, Mostaganem et Ain Defla durant 2008-2014

**Fig. 39** : Répartition des géotypes des isolats de *Phytophthora infestans* collectés dans le nord-ouest d'Algérie durant 2008-2014

**Fig. 40** : Fréquences des géotypes de *Phytophthora infestans* dans chaque site de prélèvement durant la période 2008-2014

**Fig. 41** : A : Fréquence des sous-groupes du géotype 13\_A2 dans l'ensemble de la population étudiée dans le nord-ouest algérien ; B : Fréquence des sous-groupes du géotype 13\_A2 dans les régions, Mostaganem et Ain Defla

**Fig. 42** : Dendrogramme des isolats de *Phytophthora infestans* obtenu par l'analyse des données SSR avec la méthode UPGMA en utilisant les coefficients Jaccard sous Matlab

## Liste des Tableaux

**Tableau 1** : Classification de *Phytophthora infestans*

**Tableau 2** : Nombre des isolats obtenus par année

**Tableau 3** : Classement des isolats selon le diamètre moyen des colonies, après 10 jours d'incubation sur deux milieux de culture

**Tableau 4** : Classement des milieux de culture selon le diamètre moyen des colonies après 10 jours d'incubation

**Tableau 5** : Classement des milieux de culture selon la sporulation moyenne des isolats, après 10 jours d'incubation

**Tableau 6** : Classement des facteurs, lumière et obscurité en groupes, selon le diamètre moyen des colonies développées par les isolats étudiés

**Tableau 7** : Classement des isolats en groupes, selon la sporulation moyenne à la lumière et à l'obscurité

**Tableau 8** : Classement des facteurs, lumière et obscurité en groupes selon la sporulation moyenne des isolats étudiés

**Tableau 9** : Classement des isolats en groupes, selon le diamètre moyen des colonies, après 10 jours d'incubation à quatre températures (5, 10, 20, et 25°C)

**Tableau 10** : Classement des isolats en groupes, selon le nombre de spores par lésion sur 3 variétés (Agora, Spunta, Sarpo Mira)

**Tableau 11** : Classement des variétés pour la variable Sporulation par lésion

**Tableau 12**: Classement des isolats en groupe, selon la capacité de sporulation sur 3 variétés (Agora, Spunta, Sarpo Mira)

**Tableau 13** : Classement des variétés pour la variable capacité de sporulation

**Tableau 14** : Fréquence des allèles et indice de la diversité génétique des *loci* SSR

## Acronymes

<b>ADN :</b>	ACIDE DESOXYDE NUCLEIQUE
<b>AFLP :</b>	AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS
<b>ANOVA :</b>	ANALYSIS OF VARIANCE
<b>ARN:</b>	ACIDE RIBONUCLEIQUE
<b>A1 :</b>	TYPE DE COMPATIBILITE SEXUEL A1
<b>A2 :</b>	TYPE DE COMPATIBILITE SEXUEL A2
<b>CNCC :</b>	CENTRE NATIONAL DE CONTROLE ET DE CERTIFICATION DES SEMENCES ET PLANTS
<b>FAO :</b>	FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS
<b>ITCMI :</b>	INSTITUT TECHNIQUE DES CULTURES MARAICHES ET INDUSTRIELLES
<b>MLG :</b>	MULTI LOCUS GENOTYPE
<b>MADR :</b>	MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DU DEVELOPPEMENT RURAL
<b>mtDNA :</b>	DNA MITOCHONDRIAL GENOME
<b>PCR :</b>	POLYMERASE CHAIN REACTION
<b>RAPD :</b>	RANDOM AMPLIFICATION OF POLYMORPHISMS
<b>RFLP :</b>	POLYMORPHISME DE LONGUEUR DES FRAGMENTS DE RESTRICTION
<b>SSR:</b>	SIMPLE SEQUENCE REPEAT
<b>UPGMA:</b>	UNWEIGHTED PAIR-GROUP METHOD WITH AVERAGE LINKAGE

# Introduction générale

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) et la tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) représentent les principales cultures maraîchères en Algérie, de point de vue superficie et production. La superficie consacrée à la culture de la pomme de terre est de 161156 ha avec une production de 4886538 de tonnes en 2014, et celle consacrée à la tomate est de 22 646 ha avec une production 1065609 de tonnes en 2014 (FAOSTAT, 2016).

Ces deux cultures sont sujettes à plusieurs maladies dont la plus redoutable est le mildiou qui constitue l'une des maladies les plus largement distribuées lorsque les conditions climatiques sont favorables. Cette maladie est causée par l'oomycète, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, une espèce hétérothallique avec deux types sexuels A1 et A2.

Les pertes de rendements des cultures de pomme de terre et de tomate dues au mildiou varient de 20 à 50% dans les pays développés et peuvent aller jusqu'à la perte totale de la récolte dans le cas d'attaque sévère de variétés sensibles (Goodwin et *al.*, 1998). Entre 1845-1846, les dégâts de cette maladie en Irlande ont provoqué une grande famine qui a entraîné le décès de plus d'un million d'habitants et la migration de plus d'un million et demi de personnes (Fry et Goodwin, 1997).

Durant la dernière décennie, particulièrement en 2007-2008, les zones de production de la pomme de terre en Algérie ont connu une grande épidémie de mildiou. Suite aux dégâts énormes enregistrés, surtout dans la région du nord-ouest, la production de cette culture a chuté de 22 millions de quintaux en 2006 à 15 millions de quintaux en 2007 (MADR, 2008).

La lutte chimique représente la principale mesure de lutte contre le mildiou, mais l'utilisation massive des produits chimiques systémiques surtout ceux qui appartiennent au groupe des phénylamides, conduit à l'apparition de souches résistantes à ces matières actives. Par conséquent, le meilleur moyen reste la lutte génétique, reposant sur la création de variétés résistantes, mais un autre problème se pose là aussi, c'est l'apparition de souches de *P. infestans* capables de contourner les résistances introduites dans ces variétés.

Devant une telle situation, il est devenu nécessaire de connaître les caractéristiques de la population algérienne de *P. infestans* pour élaborer des stratégies de lutte convenables contre cette maladie.

Le travail que nous avons proposé dans cette étude se compose de trois chapitres :

Le premier chapitre rapporte une synthèse bibliographique sur l'importance des deux cultures, pomme de terre et tomate dans le monde et en Algérie avec une description détaillée des symptômes de la maladie et les caractéristiques de l'agent pathogène, son cycle biologique et les facteurs influençant son développement ainsi que les différentes méthodes de lutte. Nous avons présenté aussi les différents marqueurs phénotypiques et génotypiques utilisés dans l'étude de la diversité génétique des populations de *P. infestans* à travers le monde.

Le deuxième chapitre porte sur la caractérisation phénotypique et génotypique des isolats de *P. infestans* prélevés de pomme de terre et de tomate dans la région nord-ouest d'Algérie durant la période 2008-2014 selon les paramètres suivants :

- Le type sexuel
- L'effet de quelques facteurs (milieu de culture, lumière et obscurité, température) sur la croissance mycélienne et la sporulation de *P. infestans*
- La résistance des isolats au métalaxyl, un fongicide systémique largement utilisé dans la lutte contre le mildiou de la pomme de terre.
- L'agressivité des isolats sur différentes variétés de pomme de terre et tomate.

Concernant la caractérisation génotypique, nous avons étudié la diversité génétique des isolats algériens de *P. infestans* en utilisant les marqueurs microsatellites (SSRs). Ces marqueurs sont très utilisés dans l'étude de la structure génétique des populations de *P. infestans* dans le monde (Montarry et *al.*, 2010 ; Harbaoui et *al.*, 2013 ; Tian et *al.*, 2014; Paurson et *al.*, 2015).

Le dernier chapitre est consacré à la présentation et la discussion des résultats obtenus.

CHAPITRE

1

# **Synthèse bibliographique**

---

# Chapitre I

## Synthèse bibliographique

### **I-1 Généralités sur la pomme de terre et la tomate**

#### **I-1.1 La pomme de terre**

##### **I-1.1.1 Importance économique dans le monde**

La pomme de terre est une plante vivace herbacée tubéreuse de la famille des Solanacées. Originnaire d'Amérique du sud, elle fut introduite en Algérie au milieu du 19<sup>ème</sup> siècle (FAOSTAT, 2007). La pomme de terre est reconnue comme aliment de base pour la population mondiale. Elle représente une bonne source d'énergie grâce à l'amidon renfermé dans ses tubercules et joue un rôle essentiel dans les projets de réduction de la pauvreté et la sécurité alimentaire du monde en développement (FAOSTAT, 2007). A l'échelle mondiale, la pomme de terre est la principale denrée alimentaire non céréalière et la cinquième denrée agricole produite après la canne à sucre, le maïs, le riz et le blé (FAOSTAT, 2014). En 2014, la production mondiale de pomme de terre est estimée à 385 millions de tonnes, pour une surface cultivée de 18,8 millions d'hectares (FAOSTAT, 2014). Elle est cultivée aujourd'hui dans plus de 150 pays dont la Chine est devenue le premier pays producteur. L'Asie et l'Europe concentrent 80% de la production mondiale (Figure 1).

##### **I-1.1.2 Culture de la pomme de terre en Algérie**

La pomme de terre représente la principale culture maraîchère de point de vue superficie et production en Algérie. La production de cette culture a enregistré une évolution considérable durant la dernière décennie (Figure 2A). Elle est passée de 1506859 tonnes en 2007 à 4886538 tonnes sur une superficie de 161156 hectares en 2013 (FAOSTAT, 2016).

La culture de pomme de terre est pratiquée sur presque l'ensemble du territoire national, y compris les Oasis du sud du pays (Figure 2B). On distingue dans les zones du littoral et du sublittoral trois grands bassins de production représentés par trois wilayate pilotes à savoir, Mascara, Ain Defla et El Oued. Ces trois régions approvisionnent le marché de 43% de la production annuelle totale (Tria et Chehat, 2013).

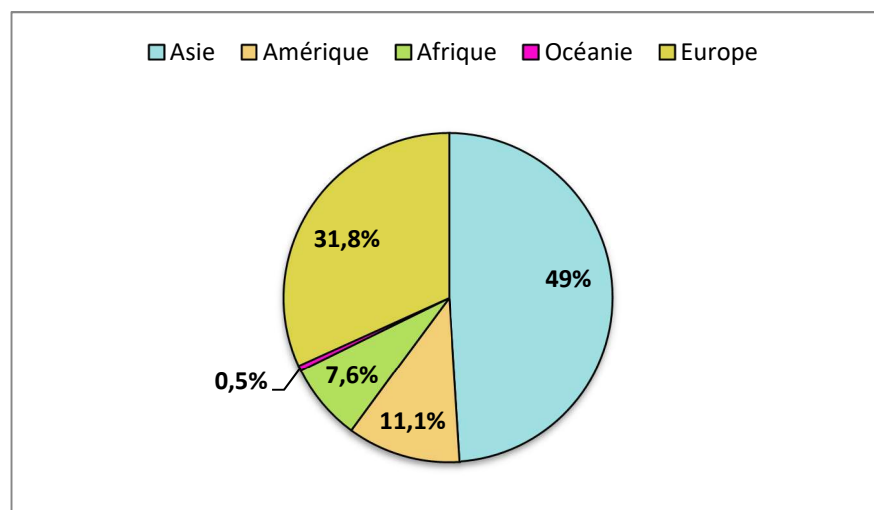


Fig. 1 : Répartition de la production mondiale de pomme de terre par continent (Source : FAOSTAT, 2014).

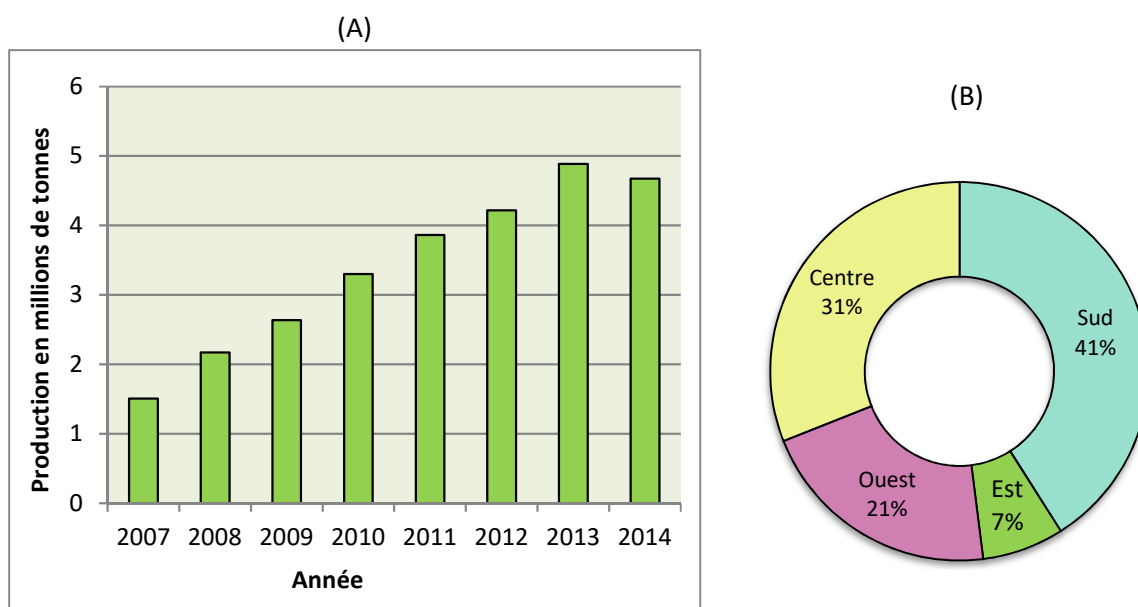


Fig. 2 : (A) : Evolution de la production de pomme de terre en Algérie 2007-2014 (Inspiré des données FAOSTAT, 2014). (B) : Répartition des surfaces de culture de pomme de terre en Algérie (MADR, 2013).

La diversité des agro-écosystèmes en Algérie permet la culture de la pomme de terre durant presque toute l'année. Néanmoins, certaines périodes correspondent à des périodes de culture représentant les principales productions (Tria et Chehat, 2013) à savoir :

- **La culture de primeur** : Elle représente 4% seulement de la production nationale et se localise sur le littoral (Mostaganem, Tipaza, Boumerdes, et Skikda). La plantation s'effectue en Octobre- Novembre.

- **La culture de saison** : C'est la plus importante, elle couvre 58% et s'étend sur la quasi-totalité du territoire national. Sur le littoral et sublittoral la plantation s'effectue en Décembre, Janvier et Février et la récolte s'étend de la mi-Mars à début Juillet. Sur les hauts plateaux et les plaines d'intérieur la plantation s'effectue de Mars à Avril.

- **La culture d'arrière-saison** : Elle couvre 38% de la production nationale et se pratique sur le littoral, les basses plaines et le Tell. La plantation s'effectue dès la fin Juin et dure jusqu'à la fin Août.

L'évolution continue des superficies destinées à la culture de pomme de terre implique une augmentation des besoins en semence, ce qui nécessite l'importation d'environ 100 000 tonnes de semence de pomme de terre chaque année pour assurer la couverture de ces besoins (MADR, 2006). Cette quantité est livrée principalement par les pays Européens surtout, les Pays-Bas, la France, le Danemark et l'Ecosse. L'importation couvre une partie des besoins de la culture de primeur et la totalité des cultures de saison. La tranche arrière-saison est assurée entièrement par la production nationale.

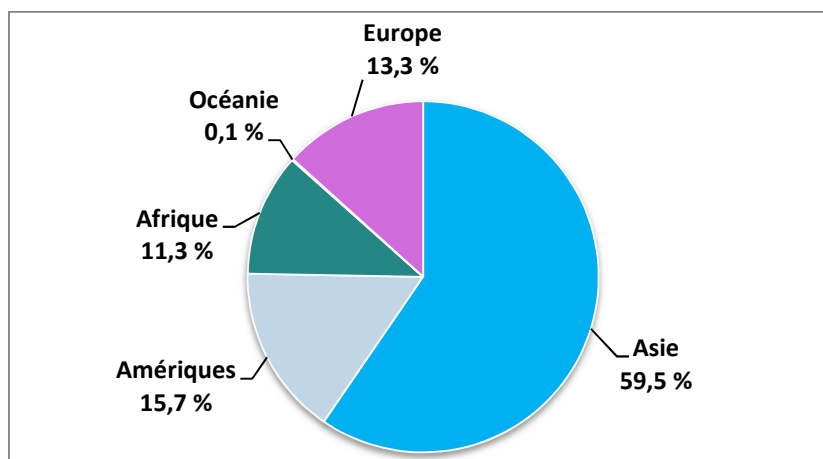
En Algérie, il existe plus de 130 variétés de pomme de terre homologuées, mais une vingtaine seulement sont cultivées dont les plus importantes sont : Bartina, Kondor, Désirée et Spunta (CNCC, 2012). Selon les statistiques de Germicopa en 2008, cette dernière variété représente 40% des volumes importés, les autres variétés occupent la deuxième place avec 35% du marché.

## **I-1.2 La tomate**

### **I-1.2.1 Importance économique dans le monde**

La tomate est une plante herbacée annuelle de la famille des Solanacées originaire d'Amérique du sud. Elle a été introduite au Maghreb vers la fin du 18ème siècle par les Espagnols et fut cultivée en Algérie vers la fin du 19ème siècle (Rey et Costes, 1965). C'est l'un des légumes les plus consommés dans le monde surtout dans les pays méditerranéens et arabes où la consommation moyenne est de 40 à 100 kg/habitant/an (FAOSTAT, 2014). Selon les statistiques de la FAO en 2013, la tomate est cultivée dans plus de 170 pays avec environ 160 millions de tonnes produites annuellement sur une surface de 4,77 millions d'hectares dans le monde. C'est par le volume de production, le troisième légume au niveau mondial, derrière la pomme de terre et la patate douce. Plus de la moitié de cette production provient d'Asie et notamment de la Chine, l'Afrique produit plus de 11 millions de la

production mondiale (Figure 3). La tomate est produite pour deux marchés distincts : la tomate maraîchère pour la consommation en frais et la tomate industrielle pour la transformation et la conserve.

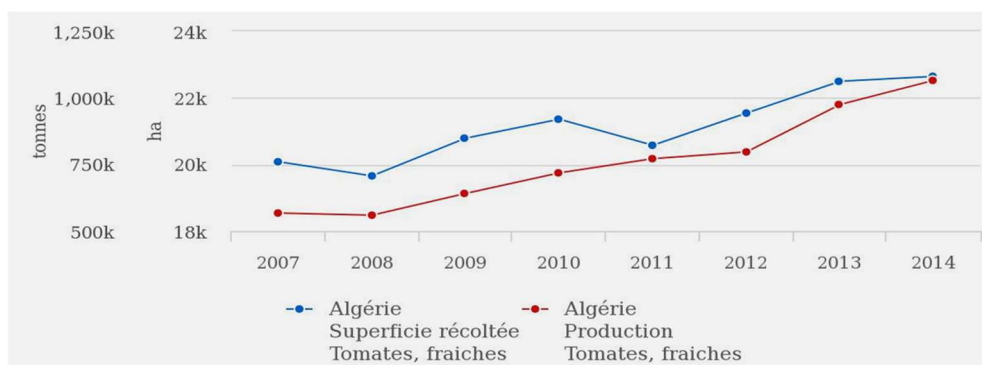


**Fig. 3:** Répartition de la production mondiale de tomate en 2014 (Source :FAO Stat, 2016).

### **I-1.2.2 Culture de la tomate en Algérie**

La culture de la tomate occupe une place importante dans l'économie nationale, tant sur le plan des superficies que sur le plan de la production, c'est le deuxième produit maraîcher après la pomme de terre et la principale culture sous serre. Les superficies consacrées à la culture de tomate couvrent environ 22 646 ha avec une production qui a évolué de 567 313 en 2007 à 1065609 de tonnes en 2014 (Figure 4) (FAOSTAT, 2014). Presque la moitié de cette production représente des tomates industrielles qui sont principalement cultivées au Nord-Est du pays. Les wilayate d'El Taref, Annaba, Guelma et Skikda représentent à elles seules 90 % de la superficie totale consacrée à cette culture (MADR, 2010).

L'augmentation de la production de tomate surtout durant les cinq dernières années n'est pas liée uniquement à l'accroissement des superficies mais aussi au développement des techniques utilisées dans le calendrier cultural et l'entretien de la culture. Malgré cette évolution, les rendements algériens restent faibles (47 tonnes par hectare) par rapport à ceux obtenus dans beaucoup d'autres pays tels que le Maroc (78 tonnes par hectare) l'Espagne (89 tonnes par hectare) (données FAOSTAT, 2014).



**Fig. 4 :** Evolution des superficies et de la production de tomate en Algérie durant la période 2007-2014 (Source : FAOSTAT : 2014).

La culture de tomate est pratiquée en plein champ et sous serre dans différentes régions du pays. Selon les conditions agro-climatiques, trois saisons de culture sont distinguées :

- **La culture de primeur** qui se pratique en majeure partie sous serre dans les régions littorales (Mostaganem, Tipaza, Alger, Boumerdes, Skikda et Jijel) et sud (Biskra, Adrar).
- **La culture d'arrière-saison**, qui se pratique essentiellement dans les régions du littoral centre et littoral ouest. La plantation est effectuée du 15 Juillet au 15 Août.
- **La culture de saison**, qui se pratique en plein champs dans toutes les régions du pays. La plantation est effectuée à partir du 15 mars.

La semence des variétés homologuées en Algérie provient de l'étranger, principalement de Hollande, de France et d'Amérique. Les variétés cultivées sous serre sont toutes des variétés hybrides à croissance indéterminée dont les plus utilisées sont : Agora, Actana, Nedjma et Zahra. Pour la culture de plein champs, la plupart des variétés cultivées sont des variétés fixées de type déterminé telle que la variété, Aicha, Farouna, Joker, Marmande et Rio-grand.

## I-2 Maladie du mildiou

### I-2.1 Importance et origine

Le mildiou de la pomme de terre et de la tomate est une maladie qui a marqué l'histoire de l'humanité. Entre 1846 et 1851, les dégâts de cette maladie sur les cultures de pomme de terre en Irlande ont causé une grande famine qui a entraîné le décès d'un million d'Irlandais et la migration d'autant de personnes vers le Continent américain (Corbaz, 1990; Rousselle,

1996 ; Andrivon *et al.*, 1998). En Suisse, les pertes étaient d'autant plus sévères qu'on n'osait pas manger les tubercules atteints, de peur d'être soi-même malade ! (Corbaz, 1990).

Selon les estimations du centre international de la pomme de terre (CIP) en 1995, la maladie peut provoquer des pertes allant de 10 à 15% de la production globale annuelle. Ainsi, les pertes de rendements des cultures de pomme de terre et de tomate dues au mildiou varient de 20 à 50% dans les pays développés (Goodwin *et al.*, 1994) et peuvent aller jusqu'à la perte totale de la récolte dans le cas d'attaques sévères de variétés sensibles (Andrivon *et al.*, 1997).

Plusieurs auteurs pensent que la maladie est originaire de la vallée de la Toluca au Mexique (Harrison, 1992 ; Grünwald *et al.*, 2000 ; Kenneth *et al.*, 2002 ; Grünwald et Flier, 2005), où la diversité génétique des populations de *P. infestans* est très importante (Niederhauser, 1991). Cependant, les dernières recherches de Gomez-Alpizar *et al.* en 2007 situent l'origine du mildiou dans la même partie du monde que l'ancêtre de la pomme de terre, soit dans les Andes en Amérique du sud. L'extension de la maladie, à partir de son aire d'origine s'est déroulée en plusieurs étapes à partir des années 1840 (Figure 5). En Amérique du Nord, le mildiou a été observé pour la première fois en 1843 près de Philadelphie aux États-Unis tandis qu'en Europe la maladie a fait son apparition en 1845 (Montarry, 2007). En Afrique, le mildiou a été détecté pour la première fois en 1941 en Afrique du Sud (Sedigui *et al.*, 1997).

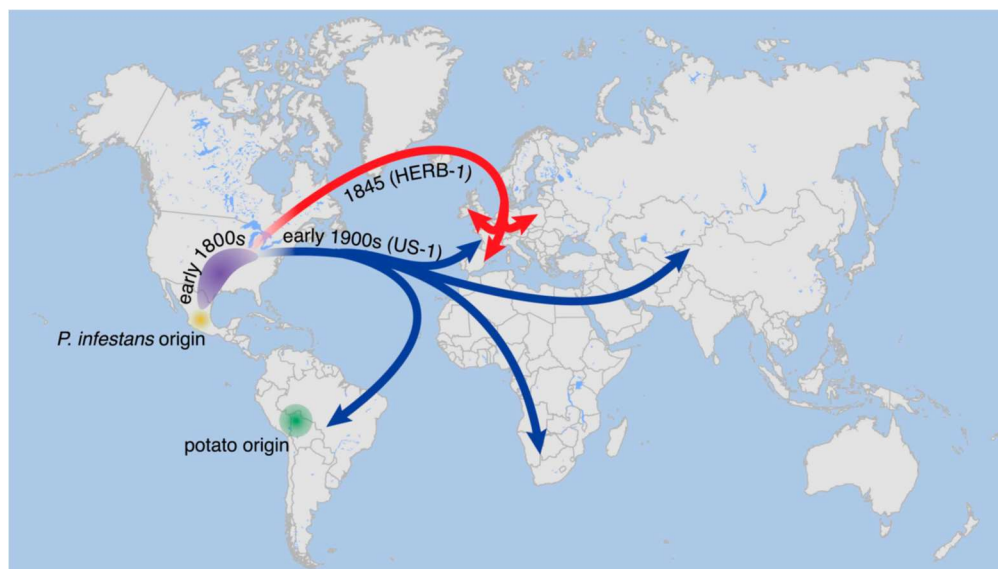
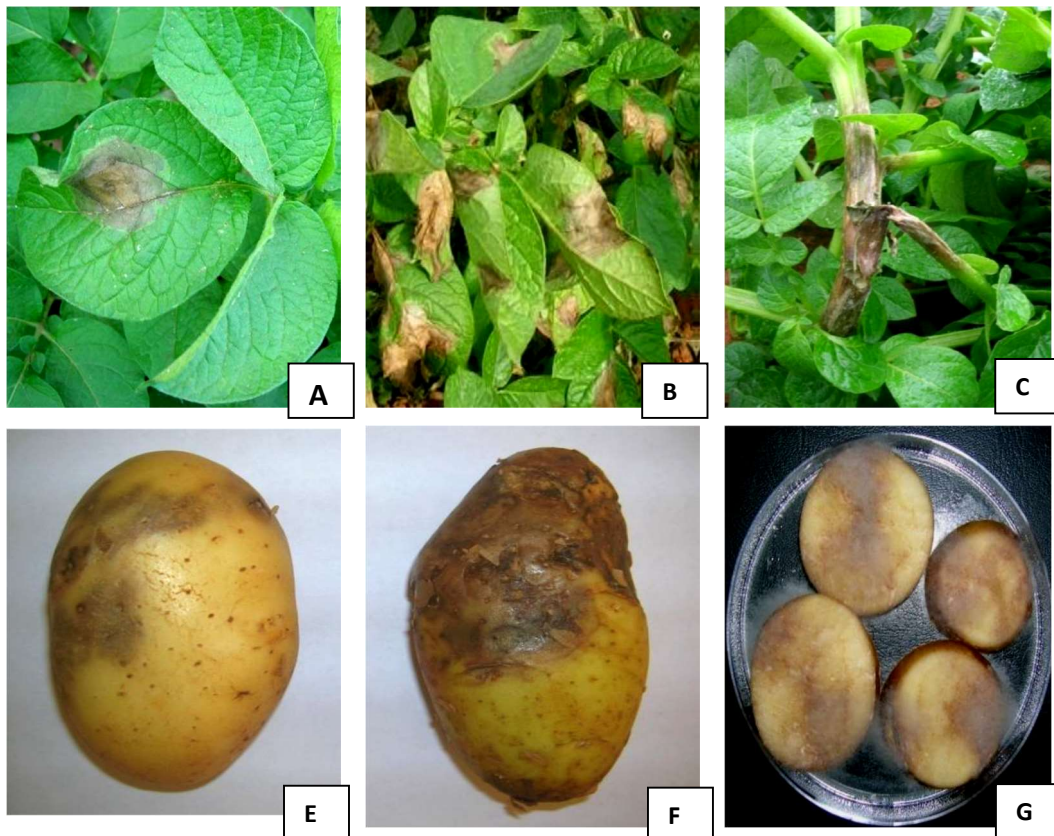


Fig. 5 : Chemins suggérés de migration des anciennes lignées de *Phytophthora infestans* à travers le monde (Yoshida *et al.*, 2013).

## I-2.2 Symptômes de la maladie

### I-2.2.1 Symptômes sur pomme de terre

Le mildiou peut toucher tous les organes de la plante : feuilles, pétioles, jeunes pousses, bouquets terminaux, tiges et tubercules (Figure 6).



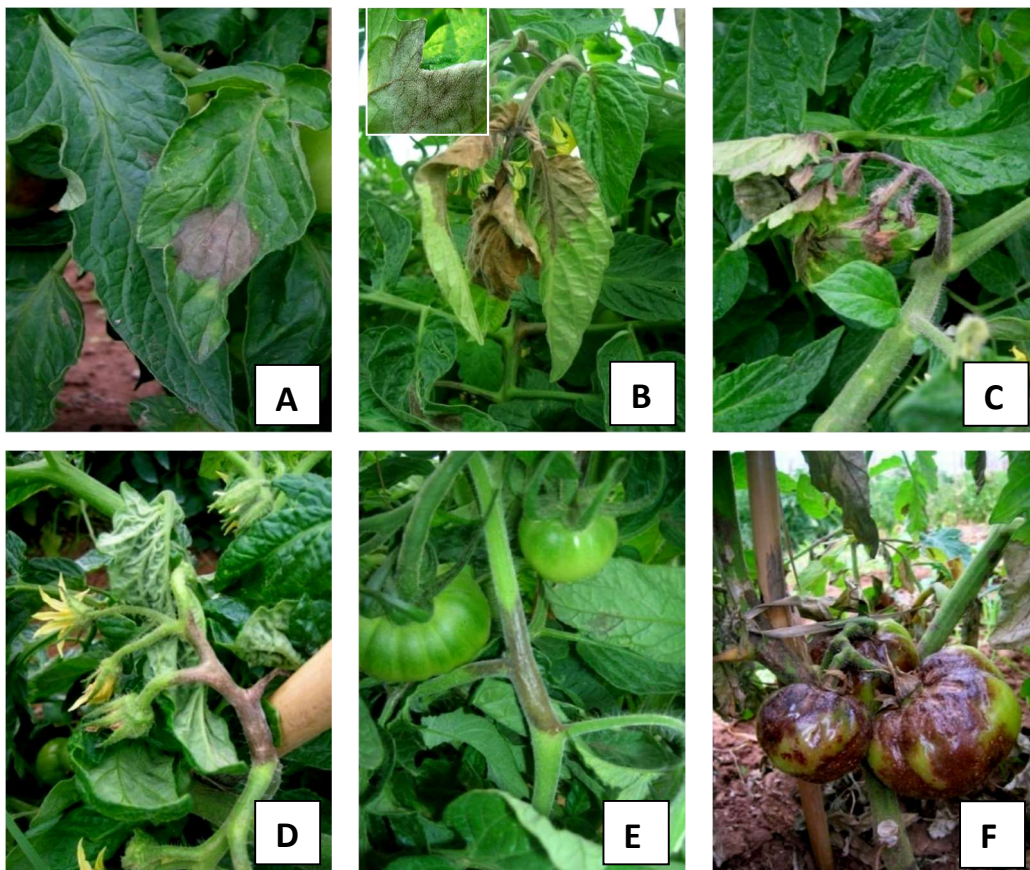
**Fig. 6 :** Symptômes de mildiou sur feuilles, tiges et tubercule de pomme de terre. **A)** : Tache sur la face supérieure de la feuille ; **B)** : Tache sur la face inférieure ; **C)** : Symptômes sur pétioles et tiges, **D)** ; **E)** ; **F)** : Symptômes de mildiou sur tubercule (Photographie F. Z. Rekad).

- Les jeunes pousses attaquées sont grêles et couvertes d'un duvet blanchâtre (fructification du parasite). Elles sont en général détruites très rapidement et donc rarement détectées par l'agriculteur.
- Sur les feuilles et les tiges des plantes attaquées, on observe d'abord des zones vert-pâle, aqueuses, à contour irrégulier, qui s'étendent lorsque les conditions sont favorables. Les zones infectées forment des lésions nécrotiques brunes ou noir-violet entourés d'un halo vert-pâle à jaunâtre. En peu de temps, l'infection peut gagner des folioles entières, les pétioles et la tige, et la plante finit par mourir. Par temps humide, on voit apparaître à la périphérie de la zone infectée, généralement à la face inférieure de la feuille, un amas blanc et duveteux de mycélium et de sporanges servant à la reproduction asexuée.

- Les attaques sur bouquets terminaux se manifestent par un brunissement et un léger recroquevillement des feuilles apicales ; la zone nécrosée s'étend alors le long des tiges, provoquant un dessèchement progressif des folioles.
- Sur tubercules, les attaques surviennent en cas de précipitations abondantes lors de la phase de grossissement. A la récolte ou quelques semaines après, le mildiou se révèle par des plages superficielles irrégulières, gris bleuâtres, violacées ou brunes. En section, on remarque des zones marbrées de couleur rouille ou brunâtres. Tandis que la chair présente une altération de couleur brunâtre avec une texture souvent granuleuse.

### I-3.2.2. Symptômes sur la tomate

Toutes les parties aériennes d'un plant de tomate peuvent présenter des symptômes (Figure 7).



**Fig. 7 :** Symptômes de mildiou sur feuilles, tige et fruit de la tomate. (A) : Tache nécrotique sur la face supérieure de la feuille, (B) : Tache avec duvet blanc sur la face inférieure, (C) : Symptômes sur jeunes pousses, (D) ; (E): Symptômes sur tiges, (F) : Symptômes de mildiou sur fruits. (Photographie F. Z. Rekad).

- Sur les feuilles, des taches d'aspect huileux débutent à l'extrémité ou à la marge des folioles. Ces taches se développent rapidement et à la face inférieure, un feutrage blanchâtre se développe en atmosphère humide ;
- Sur tiges et pétioles, de grandes taches brunes apparaissent mais ce symptôme étant commun à d'autres maladies, il ne peut à lui seul permettre la détermination ;
- Les symptômes sur fruits se manifestent sous forme de marbrures brunes souvent bosselées. Si l'attaque est plus tardive, les plages marbrées sont plus homogènes. Ces taches sont parfois recouvertes de mycélium.

### **I-2.3 Méthodes de lutte**

La priorité de la lutte contre le mildiou est d'empêcher l'installation de la maladie, et de réduire au maximum la vitesse de propagation de l'agent pathogène (Lebreton, 1998). Lorsque les infections sont déclarées, il faut limiter le plus possible leur développement pour préserver le feuillage et aussi pour éviter la contamination ultérieure des tubercules (Duvauchelle et Andrivon, 1996).

#### **I-2.3.1 Lutte prophylactique**

Le meilleur moyen préconisé actuellement est d'abord de limiter au maximum les sources d'inoculum primaire en éliminant principalement les tas de déchets, les tubercules infestés laissés au champs après récolte, (Gaucher et *al.*, 1998). L'utilisation d'une semence saine est aussi indispensable. Ces mesures sont essentielles pour limiter l'importance des attaques et retarder leur développement. (Duvauchelle et Andrivon, 1996).

#### **I-2.3.2 Lutte chimique**

La lutte chimique préventive et éventuellement curative, avec l'utilisation de fongicides de contact, pénétrant ou systémique, reste la principale mesure contre cette maladie (Gaucher et *al.*, 1998). Toutefois, l'utilisation massive de fongicides systémiques a conduit à la sélection des souches résistantes à ces matières actives, qui appartiennent principalement au groupe des phénylamides (métalaxyl et son énantiomère méfénoxam, béalaxyl, oxadixyl) (Gisi et Cohen, 1996). De plus, les effets nocifs de l'emploi des pesticides sur la santé des utilisateurs et sur l'environnement obligent aujourd'hui à les utiliser d'une façon plus raisonnée.

### **I-2.3.3 Lutte génétique**

De nombreux programmes reposant sur l'introduction de gènes de résistance ont été engagés, avec pour but la sélection de variétés ayant une bonne valeur agronomique et une bonne résistance au mildiou. Ces programmes se sont longtemps basés sur l'introduction de résistances spécifiques, à caractère monogénique. Onze de ces gènes (R1-R11) ont été identifiés et introduits chez *S. tuberosum* à partir de *Solanum demissum* (Black et al., 1953 ; Malcolmson et Black, 1966 ; Wastie, 1991 ; Cooke D.E.L. et al., 2003). Mais ces résistances ont été rapidement contournées par certains isolats du pathogène entraînant la perte rapide de leur efficacité (Wastie, 1991). Durant les deux dernières décennies, plus de 40 gènes de résistance R contre le mildiou de la pomme de terre ont été identifiés à partir de différentes espèces de Solanacées sauvages ( Sliwka et Zimnoch-Guzowska, 2013)

Les sélectionneurs s'orientent actuellement vers des résistances non spécifiques à des races du parasite, mais partielles, polygéniques dont l'effet principal est de réduire la vitesse d'extension de la maladie. Le nombre élevé de gènes impliqués dans ces résistances rend leur sélection difficile, mais offre en général de meilleures garanties de durabilité (Duvauchelle et Andrivon, 1996).

## **I-3 L'agent pathogène**

### **I-3.1 Taxonomie**

Le genre *Phytophthora* fut décrit pour la première fois par Heinrich Anton de Bary en 1875. Parmi les espèces les plus connues de ce genre, *P. infestans* (Zentmyer, 1983). *Phytophthora* est un membre du Règne des Chromista, Phylum, Oomycota, Ordre des Péronosporales et Famille des Pythiaceae. (Cavalier-Smith, 1986; Hawksworth et al., 1995).

Dans les anciennes classifications, plusieurs caractéristiques phénotypiques et biochimiques ont conduit au classement des oomycètes au sein du règne des champignons. Parmi ces caractéristiques communes, on trouve la structure filamenteuse, l'absence de pigment chlorophyllien et l'organotrophie. Cependant, la présence de cellulose dans les parois cellulaires, la diploïdie au cours de l'essentiel du cycle de développement, l'existence de zoospores biflagellées et les analyses phylogénétiques moléculaires montrent que les

oomycètes n'appartiennent pas au règne des champignons. (Hackett et *al.*, 2007; Harper, Waanders et Keeling, 2005; Martens, Vandepoele et Van de Peer, 2008).

Les dernières études taxonomiques et phylogéniques ont démontré que les oomycètes sont des straminopiles, et donc plus proches des algues brunes que des champignons supérieurs (Kroon et *al.*, 2004 ; Avila- Adame et *al.*, 2006).

**Tableau 1** : Classification de *Phytophthora infestans* d'après Alexopoulos et *al.*, 1996 ; Agrios, 1997.

<b>Règne</b>	<b>Stramenopila</b>
<b>Embranchement</b>	<b>Oomycota</b>
<b>Classe</b>	<b>Oomycète</b>
<b>Ordre</b>	<b>Péronosporales</b>
<b>Famille</b>	<b>Pythiaceae</b>
<b>Genre</b>	<b>Phytophthora</b>
<b>Espèce</b>	<b><i>Phytophthora infestans</i></b>

### **I-3.2 Description morphologique**

*P. infestans* possède un mycélium coenocytique hyalin à développement endogène (intercellulaire et intracellulaire) (Thurston et Shultz, 1981). Le mycélium est constitué d'une masse plus au moins dense de filaments ramifiés non cloisonnés. La composition de leur paroi diffère des vrais champignons par la nature du stérol de leur membrane plasmique (le flucostérol au lieu de l'ergostérol) ainsi que par la nature de leur substance de réserve (les mycolaminarines au lieu de glycogène). La reproduction asexuée de *P. infestans* est assurée par les sporanges qui sont produites à l'extrémité de conidiophores peu différenciés sortant par les stomates des feuilles infectées (Lepoivre, 2003). Ces dernières en position terminale ont la forme de citron et possèdent une papille apicale. Les sporanges renferment des cellules biflagellées mobiles appelées zoospores (Thurston et Shultz, 1981). La reproduction sexuée donne naissance à des oospores, organes sexués de 24 à 46 µm de diamètre protégés par une membrane très résistante ayant 3 à 4 µm d'épaisseur. Ces structures de conservation peuvent survivre pendant des années dans le sol. (Williams et Pat, 1994).

### **I-3.3 Gamme d'hôtes**

En plus de la pomme de terre et de la tomate, plusieurs Solanacées sauvages et d'autres genres et espèces d'arbres tropicaux se sont révélées des hôtes pour ce pathogène. D'après

Andersson (2007), *P. infestans* est capable d'infecter d'autres hôtes alternatifs tel que : *Solanum nigrum* (morelle noire) et *Solanum physalifolium*. Aux Etats Unis, plusieurs investigations ont confirmé que la morelle (*Solanum sarachioides*) pétunia (*Petunia hybrida*) et l'aigre-doux (*Solanum dulcamara*) constituent des hôtes préférés de l'espèce *P. infestans* (Laing, 1998 ; Stevenson et al., 2001). Erwin et Ribeiro (1996) ont rapporté que d'après des inoculations artificielles au laboratoire et des observations en plein champ, le pathogène *P. infestans* peut attaquer 89 espèces. Selon Christine et al. (2000), la croissante apparition récemment de nouveaux génotypes de *P. infestans*, a contribué à l'élargissement de la gamme hôtes de ce pathogène.

### **I-3.4 Cycle de vie et épidémiologie**

Les principales phases du cycle de développement du parasite et de la maladie sont présentées sur la figure 8. L'installation et l'évolution de la maladie sont largement déterminées par les conditions climatiques. Une température comprise entre 16 et 22° C et une humidité relative supérieure à 90% sont particulièrement favorables au développement de la maladie. Dans ces conditions, la durée du cycle infectieux est de 3 à 5 jours (Blancard et al., 2007).

#### **I-3.4.1 Conservation hivernale du parasite et formation d'inoculum primaire**

Elle s'effectue principalement sous forme de mycélium conservé dans les tubercules. Ce mycélium migre du tubercule vers le feuillage lors du développement de la plante sur les tas de déchets ou repousses dans d'autres cultures pour constituer les foyers primaires, qui sont des véritables réservoirs d'inoculum. L'inoculum primaire se constitue sous forme de sporanges, les zoospores libérées par les sporanges contaminent les feuilles des nouvelles plantes et sont à l'origine des sporanges de l'inoculum secondaire, à partir duquel le parasite se multiplie par cycles successifs. (Gaucher et al., 1998). Au printemps suivant, les différentes formes de conservation (mycélium ou oospores) donnent des sporanges, qui peuvent être disséminés sur de longues distances par le vent et la pluie, assurant ainsi l'extension de l'épidémie. Selon la température, les sporanges germent directement (émission immédiate d'un nouveau mycélium), ou libèrent des zoospores biflagellées qui germeront au contact de l'hôte pour pénétrer dans les tissus de la face supérieure des feuilles où se développe un réseau mycélien intra et intercellulaire. Des sporangiophores, formés à travers

des stomates de la face inférieure des feuilles, libèrent l'inoculum secondaire (sporangies et zoospores).

L'espèce *P. infestans* se caractérise par l'existence de deux types sexuels complémentaires A1 et A2 (Smoot et al., 1958). Afin que la reproduction sexuée puisse survenir, il est essentiel d'avoir la présence des deux types sexuels (Turkensteen et al., 2000). Après confrontation entre les anthéridies (organe de reproduction mâle), et les oogones (organes de reproduction femelle) les oospores (Figure 8) sont formées selon les réactions de chacun des types sexuels vis-à-vis de l'hormone produite par le type sexuel opposé (Ko, 1988 ; Shaw, 1987). Les oospores peuvent être formées selon trois mécanismes différents : par apomixie, autofertilité ou par reproduction sexuée croisée. Cependant, l'importance relative des oospores formées par ces trois voies reste indéterminée (Christine et al., 1999). Les oospores formées au sein des tissus foliaires sont capables, après la chute des feuilles, de se maintenir plusieurs hivers au champ puis de réinfecter une culture de pomme de terre (Drenth et al., 1995). Elles peuvent jouer un rôle important dans l'épidémiologie de la maladie car elles constituent une forme de conservation à long terme de l'inoculum dans le sol et ne peuvent être détruites par les moyens de lutte (Radtke et Rieckmann, 1991).

#### **I-3.4.2 Développement au champ et contamination des tubercules**

Les foyers primaires vont contaminer les parcelles cultivées pour former de petits foyers localisés et peuvent, en quelques semaines, gagner toute la parcelle, puis les spores présentes sur le feuillage sont entraînées par l'eau de pluie, s'enfoncent dans le sol et pénètrent dans les tubercules par les lenticelles ou par les blessures. (Gaucher et al., 1998). Mais le principal agent de dispersion de *P. infestans* est le vent qui assure l'extension de la maladie au-delà de la parcelle. L'épidémie peut être ainsi qualifiée de régionale car les spores de contamination peuvent être transportées jusqu'à 11 km de distance des foyers primaires (Van der Zaag, 1956).

### **I-4. L'influence de certains facteurs sur la croissance mycélienne et la sporulation chez *Phytophthora infestans***

*P. infestans* se comporte dans la nature comme un biotrophe obligatoire (Isaac, 1992 ; Hammond-Kosack et Parker, 2003), sans capacité de survie saprophyte, mais il peut tout de même être isolé et cultivé en milieu de culture artificiel (Andrivon, 1995). *P. infestans* est un parasite exigeant qui nécessite certains facteurs stricts pour se développer et se reproduire.

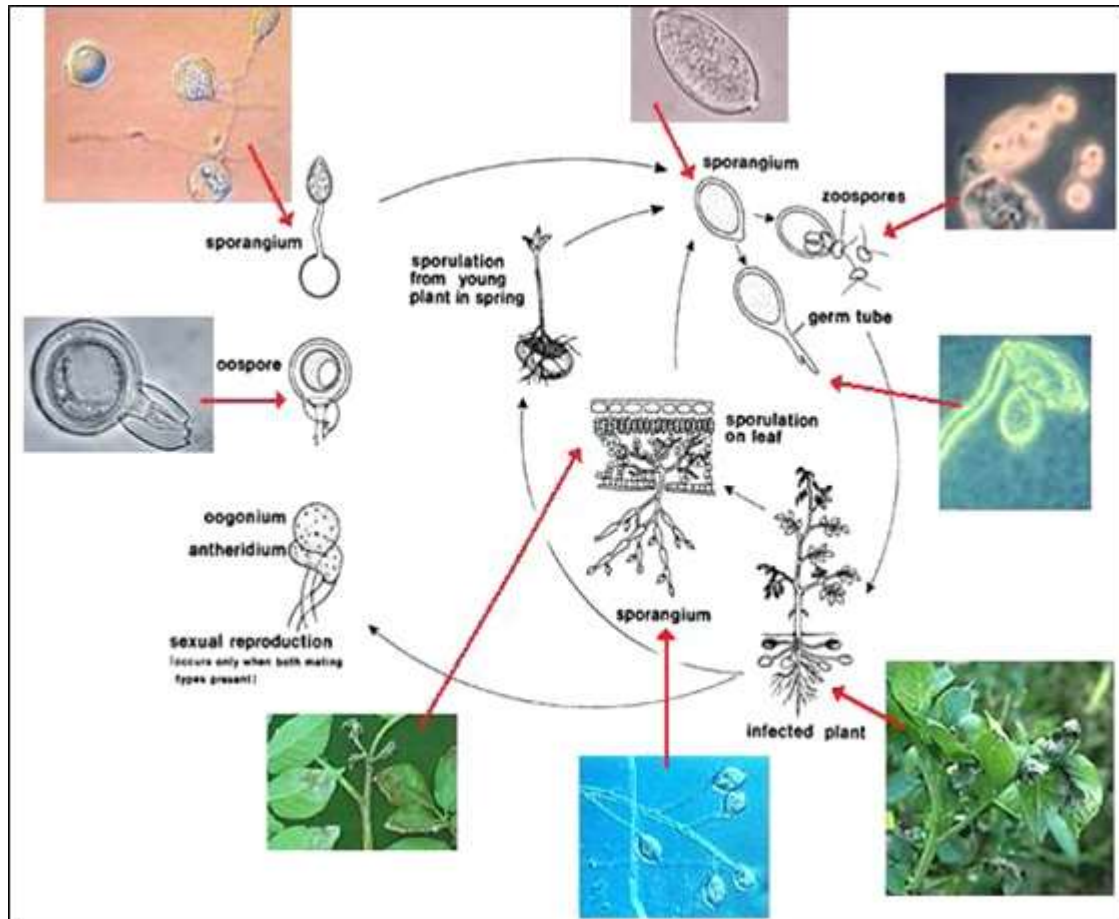


Fig. 8 : Cycle de développement de *Phytophthora infestans*. (Source : <http://www.apsnet.org>).

#### I-4.1. Les exigences trophiques

*P. infestans* peut être cultivé in vitro sans plante hôte sur différents substrats liquides ou gélosés, synthétique ou à base d'extraits végétaux. Les souches du pathogène exigent des apports particuliers pour pousser en dehors de la plante. Certains isolats, se développant sur le milieu synthétique, exigent des sources d'azote particulières tels que le nitrate, l'ammonium, l'asparagine, l'histidine et la purine (Hohl, 1983). Les valeurs élevées du rapport C/N (50 à 100) favorisent la croissance mycélienne au détriment des différentes formes de sporulation. C'est autour de 30 que la valeur du rapport C/N est la plus favorable à la reproduction sexuée (Boccas, 1979). La présence de certains produits comme les stérols est essentielle pour la fabrication des oospores (Hohl, 1983).

## **I-4.2. Les facteurs climatiques**

Les exigences thermiques des *Phytophthora* sont diverses, adaptées aux conditions d'environnement des différentes espèces dans leur biotope (Boccas, 1979). Chez *P. infestans*, la température optimale pour la croissance mycélienne est près de 21°C (Alexopoulos, 1962).

Chez plusieurs espèces de *Phytophthora*, les températures favorables à la reproduction sexuée sont sensiblement inférieures à celles de la croissance mycélienne (Drenth et al., 1995). La production des oospores est obtenue *in vitro* à des températures comprises entre 18 et 21°C et *in vivo* de 8 à 20°C (Cohen et al., 1997 ; Drenth et al., 1995).

Le développement et la reproduction de *P. infestans* sont largement déterminés par les conditions d'humidité (Harrison, 1992). Une humidité relative supérieure à 90% est très favorable à la germination et la production des spores (Krause et al., 1975).

La lumière a une action inhibitrice sur la reproduction sexuée chez les espèces du genre *Phytophthora*. C'est la phase d'induction précédant la différenciation des gamétocystes qui est photosensible (Boccas, 1979).

## **I-5 Marqueurs utilisés pour la caractérisation des populations de *Phytophthora infestans***

### **I-5.1 Variabilité phénotypique**

Les différents marqueurs phénotypiques utilisés pour distinguer les populations de *P. infestans* à travers le monde sont basés sur la détermination du type sexuel, spectre de virulence, agressivité et résistance au metalaxyl (Fry et al., 1993).

#### **I-5.1.1 Type sexuel**

*P. infestans* est un oomycète hétérothallique, c'est-à-dire qu'il possède deux types de compatibilité sexuelle, dits A1 et A2 (Smoot et al., 1958). La production d'oospores, résultant de la reproduction sexuée, intervient uniquement lorsque des souches appartenant à des types sexuels opposés sont en présence. Ceci permet de déterminer le type sexuel d'une souche inconnue lorsqu'elle est confrontée avec des souches de référence de type A1 ou A2. Il existe cependant des exceptions à cette règle car de nombreux isolats de *P. infestans* produisent des oospores en culture pure sous l'effet de divers stimulants tel que certains fongicides (Groves et Ristaino, 2000).

Jusqu'au début des années 1980, le type sexuel A1 dominait dans toutes les régions du monde à l'exception du Mexique central où les deux types sexuels A1 et A2 coexistaient (Niederhauser, 1991 ; Andrivon, 1996). Vers la mi-1980, les souches A2 ont été détectées dans d'autres régions du monde. En Europe, le type sexuel A2 a d'abord été mis en évidence en Suisse en 1981, suite à une introduction probable de souches A2 via une importation importante de tubercules de pomme de terre depuis le Mexique (Hohl & Iselin, 1984 ; Lees et *al.*, 2006). Il a ensuite été identifié dans de nombreux pays du nord de l'Europe, tels que les Pays-Bas (Frinking et *al.*, 1987), l'Allemagne (Rullich et Schöber, 1988), la Grande-Bretagne (O'Sullivan & Dowley, 1991), la Pologne (Therrien et *al.*, 1993) et la Norvège (Hermansen et *al.*, 2000) et aussi dans différents continents (Amérique, Asie et une partie de l'Afrique). Aujourd'hui, les deux types sexuels coexistent dans différentes régions du monde avec des fréquences variables.

L'étude de la répartition spatiale et temporelle des deux types sexuels est indispensable pour comprendre l'étiologie de la maladie. Aussi, la surveillance du rapport A1/A2 est importante dans la prévision d'une probable reproduction sexuée et permet d'évaluer le risque de présence d'oospores de longue longévité servant comme source d'inoculum primaire et leur impact épidémiologique (Cooke et Lee, 2004). Des efforts considérables ont été déployés pour estimer les fréquences des deux types sexuels dans les populations de *P. infestans* à travers le monde (Hermansen et *al.*, 2000) ; Zwankhuizen et *al.* ; 2000 ; Cooke et *al.* ; 2003).

### I-5.1.2 Résistance de l'hôte et pouvoir pathogène des parasites

- **Notion de la résistance**

La résistance se définit comme tout phénomène qui, chez un végétal, interdit ou limite le développement d'un parasite. Cette propriété, propre à un couple hôte-parasite, se traduit par un effet mesurable au niveau de la maladie et/ou de l'épidémie (Rapilly, 1991). Selon Lepoivre (2003), la résistance exprime l'exclusion totale ou partielle d'un pathogène. Les relations entre les agents pathogènes et leurs hôtes végétaux s'établissent au niveau d'entités génétiques représentées d'une part par les biotypes (pathotypes ou races) des parasites et d'autre part par les cultivars (ou variétés) des plantes qu'ils colonisent.

Selon Van der Plank (1968), il existe deux types de résistance : la résistance verticale (spécifique) et la résistance horizontale (non spécifique). La résistance verticale est caractérisée par une interaction différentielle entre les génotypes de l'hôte et de l'agent

pathogène. C'est une résistance totale qui ne permet pas le développement de la maladie et empêche la multiplication du parasite (Parlevliet, 1979). En général, les caractères de la résistance verticale (spécifique) sont monogéniques ou oligogéniques, déterminés par un seul gène ou un nombre réduits de gènes (Lepoivre, 2003), appelés gènes majeurs de résistance (ou gène R). Ces gènes sont impliqués dans la reconnaissance entre la plante et l'agent pathogène (Montarry, 2007). Ce type de résistance s'exprime souvent par des réactions de type hypersensibilité chez l'hôte inoculé par un biotype avirulent. Elle est spécifique (la variété concernée résiste à certaines souches du parasite mais est sensible à d'autres) et tout biotype du parasite qui est capable de surmonter un facteur de résistance verticale est dit virulent à l'égard de la variété correspondante (Lepoivre, 2003). Généralement ce type de résistance est rapidement surmonté par les nouvelles races du pathogène (Pieterse et *al.*, 1992). La résistance horizontale est caractérisée par l'absence d'interactions différentielles, statiquement mesurables, entre ces mêmes entités (Lepoivre, 2003). C'est une résistance partielle qui ne permet pas de bloquer entièrement le cycle de développement du parasite (Montarry, 2007). La résistance non spécifique ou horizontale est sous le contrôle de plusieurs gènes (Umaerus, 1963). Ce type de résistance est, généralement, durable, plus stable et commercialement plus attractive (Pieterse et *al.*, 1992). Elle se traduit par un ralentissement du développement de l'épidémie dans la culture et porte en particulier sur la pénétration et la dissémination du parasite dans les tissus, l'intensité de sporulation et la période de latence entre deux cycles successifs de contamination (Van der Plank, 1968). La résistance horizontale est générale (le niveau de résistance partielle est identique vis-à-vis de tous les biotypes d'un agent pathogène déterminé). Le niveau de la résistance horizontale vis-à-vis d'une souche déterminée de l'agent pathogène peut varier en fonction des cultivars vis-à-vis desquels le parasite présente des agressivités différentes (Lepoivre, 2003).

- **Pouvoir pathogène**

Le pouvoir pathogène, ou pathogénicité, est un terme général qui inclut une composante qualitative et une composante quantitative (Watson, 1970). En phytopathologie, le terme virulence désigne la composante qualitative du pouvoir pathogène, et le terme agressivité indique la composante quantitative (Brasier, 1990).

La virulence définit la capacité du parasite à attaquer, après reconnaissance, un hôte donné. Elle est relative à l'interaction gène- pour-gène, varie par « tout ou rien » et est généralement associée à des résistances spécifiques (Person, 1966). Le pathotype d'une

souche correspond à son spectre de virulence déterminé sur une gamme d'hôtes différentielle. Ce marqueur phénotypique est très utilisé dans la caractérisation des isolats de *P. infestans* (Cooke et al., 2003 ; Rekad, 2009 ; Chmielarz et al., 2014 ; Aav A. et al., 2015 ; Savazzini et Galletti, 2015).

L'agressivité ne s'exprime que si le parasite est virulent. C'est une mesure de la quantité des symptômes (donc de la gravité de la maladie) causée par une souche donnée. Une forte agressivité peut se traduire par une apparition plus rapide de la maladie, et/ou un taux de reproduction du parasite plus élevé. Si deux races virulentes d'un agent pathogène induisent des niveaux de gravité de maladie différents sur une même plante hôte, alors ces races diffèrent par leur agressivité (Montarry, 2007).

La capacité du pathogène à contourner la majorité des gènes de résistance est un problème sérieux dans la lutte génétique contre le mildiou de la pomme de terre. Les stratégies de lutte génétique se focalisent actuellement sur l'obtention de résistances durables à travers la résistance quantitative polygénique.

L'agressivité peut être mesurée par différentes méthodes, sur des folioles détachées, sur des plants entiers, sur tubercules, dans une chambre d'incubation ou au champs (Cooke et al., 2006). Il est préférable de tester l'agressivité des isolats sur différentes variétés car certains génotypes de *P. infestans* développent une adaptation spécifique aux cultivars dominants dans la zone de production étudiée (Montarry et al., 2008 ; Lehtinen et al., 2009). Pour ce type de test, il est important de tenir compte du fait que l'agressivité peut varier entre des isolats appartenant à la même lignée. En plus, il est impossible de comparer les résultats de différents tests d'agressivité réalisés dans des conditions expérimentales variables (Lehtinen et al., 2009). Cela a été observé dans deux études effectuées par Cooke et al. (2012) et Mariette et al. (2015), la première a révélé que la lignée Blue-13 est très agressive, alors que la deuxième étude a mentionné que cette lignée s'est montrée moins agressive par rapport aux génotypes testés.

### **I-5.1.3 Résistance au métalaxyl**

La résistance au métalaxyl, substance active de quelques fongicides systémiques de la classe des phenylamides est un critère permettant de caractériser les populations du fait qu'elle constitue aussi une information intéressante pour l'établissement des stratégies de lutte chimique efficaces à l'égard du mildiou. Grâce à sa capacité à être transloqué à travers la

plante entière (systémique) pour une protection optimale contre les infections, le métalaxyl est une molécule forte intéressante pour la lutte contre le mildiou. Cependant, en raison de son mode d'action fort précis (unisite), sa propension à sélectionner, au sein des populations de mildiou, des individus résistants à son action est bien connue. Aussi, les informations concernant la capacité des populations à résister à l'action du métalaxyl sont utiles si l'on veut utiliser cette substance active à bon escient et éviter les accidents en cours de culture.

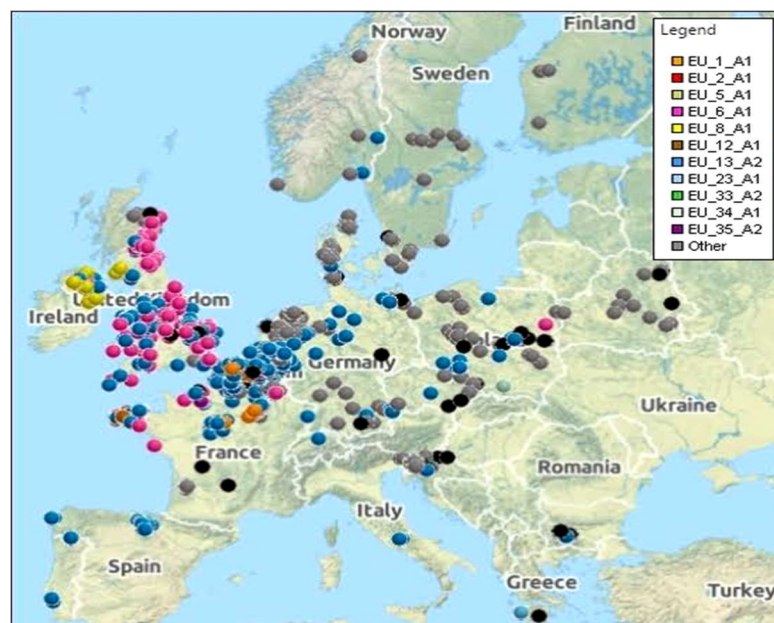
Ce fongicide systémique exerce son action fongitoxique à l'intérieur des tissus du plant (Staub *et al.*, 1980). Une fois redistribué dans la plante traitée, ce produit possède la faculté de protection des organes non encore développés au moment du traitement. Le métalaxyl inhibe la formation d'haustoria, la croissance mycélienne à l'intérieur des feuilles, la formation des lésions et la sporulation (Bruck *et al.*, 1980 ; Staub *et al.*, 1980 ; Cohen et Gisi, 2007). Des études biochimiques ont montré que le métalaxyl agit en réduisant la synthèse d'ADN, la synthèse protéique et surtout l'ensemble des ARN. En effet, il agit sur la synthèse d'ARN en inhibant l'ARN polymérase (Fischer et Hayes, 1988 ; Schwinn et Margot, 1991). D'autres études ont montré que cette inhibition est spécifique puisque seule une partie de l'ARN de synthèse est sensible au métalaxyl (Davidse *et al.*, 1981).

Au début, vers les années 1970, l'introduction de ce fongicide a été très appréciée vue sa grande efficacité contre les oomycètes. Très rapidement et vers les années 1980, des problèmes de résistance sont apparus dans plusieurs pays du monde (Reuveni *et al.*, 1980 ; Davidse *et al.*, 1981, 1983 ; Holmes and Channon, 1984 ; Pappas, 1985 ; Kadish et Cohen, 1988 ; Deahl *et al.*, 1993 ; Gisi et Cohen, 1996 ; Hammi *et al.*, 2002 ; Cooke *et al.*, 2010 ; Hamada et Harbaoui, 2010 ; Chimiélarz *et al.*, 2014). L'expression de cette résistance est souvent associée à l'utilisation intensive et unique de ce fongicide. (Staub *et al.*, 1980 ; Davidse *et al.*, 1981). Généralement, il existe certaines conditions qui sont favorables à l'apparition de cette résistance au champ (Schwinn 1991). Cette résistance peut être due à certains mécanismes tels que l'inactivation du fongicide, l'altération de son transport, la perturbation de son métabolisme ou un changement au niveau de son site d'action (Judelson et Roberts, 1999).

### **I-5.2 Variabilité moléculaire**

Au début des années 1980, les populations de *P. infestans* à travers le monde ont été dominées par une seule lignée nommée US-1 de type sexuel A1 (Fry et Goodwin, 1997 ; Goodwin *et al.*, 1994). En revanche, dans la vallée de Toluca au Mexique, centre d'origine de

*P. infestans*, les deux types sexuels coexistaient avec des proportions similaires et les populations du pathogène étaient entièrement différentes de celles présentes dans les autres régions du monde (Fry, 2008; Goodwin et al., 1992). Vers la fin des années 1980, des changements dans la structure des populations de *P. infestans* ont été signalés en dehors du Mexique (Fry and Goodwin, 1997). Cette nouvelle population, provenant de différentes migrations depuis le Mexique via les importations de pomme de terre, a rapidement remplacé l'ancienne population clonale (Spielman et al., 1991 ; Fry et al., 1993). Les nouveaux génotypes avaient un avantage sélectif comme la résistance au métalaxyl, forte agressivité, reproduction asexuée rapide et possibilité de reproduction sexuée (Day et Shattock, 1997). En 2004, des études effectuées sur les populations de *P. infestans* en Allemagne et aux Pays Bas ont révélé la présence d'un nouveau génotype de type A2, nommé 13\_A2 ou "Blue 13", très agressif et résistant au métalaxyl. Cette lignée a rapidement dominé les populations de *P. infestans* en Grande Bretagne en 2007 (Cooke et Lee, 2004 ; Cooke et al., 2012 ; Lee et al., 2012) et en Inde (chowppada et al., 2013) ainsi que d'autres régions dans le monde. Récemment, une autre lignée nommée 6\_A1 de type A1 existe avec une fréquence similaire à celle de 13\_A2 en Grande Bretagne et en France (données Euroblight, 2014), mais sans évidence que la reproduction sexuée a eu lieu. Les deux populations ont été déterminées comme clonales (Montarry et al., 2010 ; Cooke et al., 2012a). Différents génotypes sont présents actuellement en Europe (Figure 9) et dans les autres continents avec des fréquences variables.



**Figure 9 :** Répartition spatiale des différents génotypes de *Phytophthora infestans* identifiés en Europe durant 2014 (Source : [www.euroblight.net](http://www.euroblight.net)).

L'étude des populations de *P. infestans* par l'utilisation des marqueurs moléculaires a révélé une grande diversité dans la structure de ce pathogène à travers le monde (Forbes *et al.*, 1998). Différentes méthodes ont été développées afin de détecter et d'identifier rapidement les nouveaux génotypes et ainsi trouver des mesures de contrôle plus efficaces du mildiou (Trout *et al.*, 1997).

### **I-5.2.1 Les marqueurs moléculaires utilisés pour la caractérisation génotypique de *P. infestans***

Un marqueur moléculaire est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte. Les marqueurs moléculaires correspondent donc au polymorphisme révélé au niveau de l'ADN. L'analyse de ce polymorphisme par les techniques de biologie moléculaire s'adresse à l'ensemble du génome, qu'il soit ou non traduit en protéines, et est indépendante des conditions de l'environnement (Najimi *et al.*, 2003). Les méthodes moléculaires sont universellement applicables et permettent d'étudier les relations génétiques dans une population pathogène à différents niveaux (comparaison entre des souches, des espèces, des genres, etc.). Ceci est indispensable pour le développement de nouvelles variétés résistantes et la mise au point de stratégie de contrôle des épidémies.

Différents marqueurs moléculaires ont été développés afin d'étudier la diversité génétique des populations de *P. infestans*. Parmi ces marqueurs on peut citer : Isoenzyme ; mtDNA (DNA mitochondrial genome); RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction) l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ; la RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) et les microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat). En comparaison avec les différents types de marqueurs cités, les microsatellites sont largement utilisés dans la caractérisation des populations de *P. infestans* (Cooke et Lee, 2004).

#### **Marqueurs microsatellites ou SSR**

Les microsatellites sont constitués de séquences de di-, tri- ou tétranucléotides répétés en tandem. Ces éléments sont uniformément répartis en plusieurs exemplaires sur l'ensemble du génome d'une espèce et présente un taux de polymorphisme élevé. Ce dernier est dû à la variation du nombre d'unités de répétition constituant le microsatellite (Morgante et Olivieri, 1993). Par voie de conséquence, la technique SSR repose sur l'amplification de ces motifs et la détection de la différence entre le nombre de répétitions chez les individus différents. Ceci est possible après le développement d'amorces complémentaires des régions flanquant le microsatellite (Field *et al.*, 1996). Cette méthode présente l'avantage d'être reproductible et nécessite peu d'ADN, mais elle est longue et coûteuse (Verscheure *et al.*, 2002).

Après les premières études moléculaires réalisées sur les populations de *P. infestans* par l'utilisation de la technique SSR (Knapova et Gisi, 2002), différentes études ont été effectuées en utilisant cette technique pour déterminer la structure des populations de ce pathogène à travers le monde (Montarry et *al.*, 2010 ; Harbaoui et *al.*, 2013 ; Tian et *al.*, 2014; Paurson et *al.*, 2015). La plupart des résultats obtenus sur les différents génotypes identifiés et leurs fréquences dans le monde sont présentés dans la base de données du réseau Euroblight créées dans le cadre de suivi du mildiou dans le monde. L'Algérie est présente pour la première fois sur cette base de données, suite aux résultats obtenus dans la présente étude ([www.euroblight.net](http://www.euroblight.net)).

CHAPITRE

2

# **Matériels & Méthodes**

---

## Chapitre II

# Matériels et méthodes

### II-1 Présentation des sites d'échantillonnage

Dans le but d'étudier la population de *Phytophthora infestans* présente dans la région nord-ouest d'Algérie, des prospections ont été effectuées au niveau de 30 sites de production de pomme de terre et de tomate durant la période 2008-2014. Selon les données géographiques (latitude et longitude) prélevées par GPS au niveau de chaque point, les sites concernés sont répartis dans toute la zone d'étude allant de Hanaia (wilaya de Tlemcen) à Djendel (wilaya de Ain Defla (selon la longitude du lieu) (Figure 10). Deux régions de production ont été sélectionnées pour comparer les populations de *P. infestans*, il s'agit de Mostaganem (région côtière) et de Ain Defla (région intérieure).

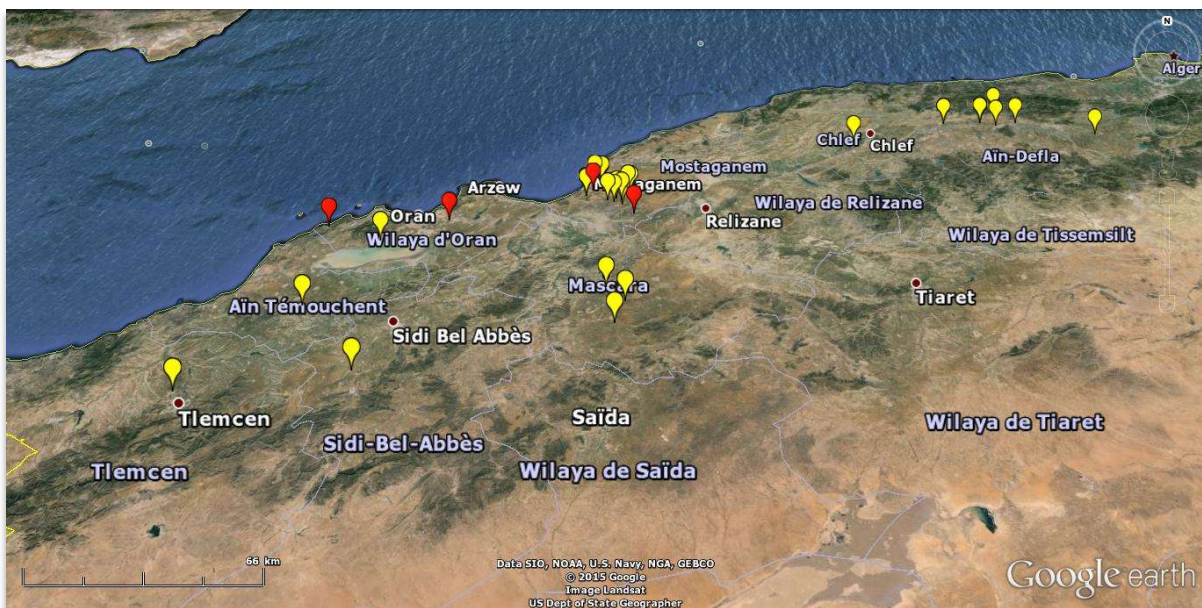


Fig. 10 : Répartition des sites d'échantillonnages dans la zone d'étude (points jaunes : pomme de terre, points rouges : tomate).

## II-2 Echantillonnage et isolement de l'agent pathogène

### II-2.1 Méthode d'échantillonnage

L'échantillonnage a été effectué de manière aléatoire dans des parcelles de pomme de terre et de tomate présentant des symptômes de mildiou. Deux à dix échantillons ont été prélevés des différents organes des plantes (feuilles, tiges, fruits et tubercules) au début des attaques puis environ vingt jours après l'apparition de la maladie. Les échantillons prélevés sont mis individuellement dans des sachets en papier et conservés au réfrigérateur pour une ultérieure utilisation.

### II-2.2 Technique d'isolement

*Phytophthora infestans* se comporte dans la nature comme un biotrophe obligatoire (Isaac, 1992 ; Hammond-Kosack & Parker, 2003), sans capacité de survie saprophyte (Andrivon, 1995), mais il peut tout de même être isolé et cultivé en milieu de culture artificiel.

Les isolements ont été réalisés à partir de différents organes de la plante (feuilles, tiges, fruits et tubercules) sur milieu petits pois (Corbière *et al.*, 2003) (Annexe 2). Suite aux caractéristiques particulières (faible pouvoir compétitif) de *P. infestans*, des antibiotiques ont été ajoutés au milieu d'isolement pour empêcher le développement de certaines bactéries et champignons (Annexe 4). Après purification des colonies, les isolats ont été conservés sur milieu solide petits pois en boîtes de Pétri à 10°C et repiqués régulièrement tous les deux mois (Annexe 5). Les isolats utilisés pour les différents tests sont présentés en Annexe 8.

## II-3 Matériel végétal

### II-3.1 Origine et utilisation des plants

Le matériel végétal utilisé est composé de tubercules de pomme de terre et de plants de tomate.

- Pour la pomme de terre, nous avons utilisé deux variétés : Spunta et Sarpo Mira, qui nous ont été fournies sous forme de tubercules sains par l'Inspection Phytosanitaire aux Frontières (IPF) de la wilaya de Mostaganem. La variété Spunta reconnue par sa sensibilité au mildiou est largement cultivée en Algérie pour sa productivité et son cycle court, alors que la nouvelle variété Sarpo Mira reconnue par sa résistance au mildiou est rarement cultivée en Algérie.

- Pour la tomate, nous avons utilisé une variété de tomate, Agora qui a été fournie sous forme de plants sains (âgés de 6 semaines) par la station expérimentale de l'Université de Chlef. Cette variété précoce est largement cultivée sous serre pour sa productivité, sa bonne qualité gustative et sa résistance aux maladies.

### **II-3.2 Culture en serre**

Les tubercules des deux variétés de pomme de terre et les plants de tomate sont plantés individuellement sous serre dans des pots préalablement préparés (Annexe 1) à raison d'un tubercule ou un plant par pot. Lorsque les tiges des plants atteignent 15 à 20 cm, les plants sont tuteurés pour faciliter le prélèvement des folioles (Figures 11 et 12).

### **II-3.3 Prélèvements des folioles**

Les prélèvements portent sur des folioles sur des plants âgés de 8 à 10 semaines. Deux types de prélèvements sont effectués selon la manipulation :

On prélève :

- Des folioles apicales de la variété Spunta pour le test de la résistance au métalaxyl et la pré-inoculation (préparation de l'inoculum pour le test d'agressivité).
- Des folioles axillaires des trois variétés (Spunta, Sarpo Mira, et Agora) pour le test d'agressivité.



**Fig. 11** : Culture sous abri des variétés de pomme de terre, Spunta et Sarpo Mira.



Fig. 12 : Culture sous abri de la variété de tomate Agora.

#### II-4 Caractérisation phénotypique

Les marqueurs phénotypiques tels que, le type sexuel, le pouvoir pathogène et la résistance aux fongicides ont été utilisés depuis longtemps pour caractériser les populations phytopathogènes. Malgré quelques inconvénients tels que le manque de précision et la difficulté de comparer des résultats, liés à la variabilité des conditions d'expérimentation, l'étude de ces paramètres s'avère indispensable pour comprendre la biologie des agents pathogènes et avoir des données complémentaires à celles obtenues par les tests moléculaires. Selon le paramètre étudié, les tests phénotypiques peuvent être réalisés *in vitro* ou *in vivo*, sur des folioles détachées ou en plein champs. La caractérisation phénotypique est importante pour une stratégie de lutte durable contre les agents pathogènes en particulier ceux connus par une capacité d'évolution rapide tels que l'espèce *P. infestans*. Il est nécessaire de déterminer le type sexuel des isolats d'une espèce hétérothallique avant de passer à n'importe quel test, condition que nous n'avons pas respecté suite à la non disponibilité des souches de référence au début de notre étude. Ce marqueur phénotypique est indispensable dans la caractérisation des populations de *P. infestans* car il permet de prévenir le risque que représentent les oospores, forme de conservation du pathogène, résultant de la confrontation des deux types sexuels opposés, A1 et A2 (Cooke et Lee, 2004). Plusieurs travaux ont été réalisés sur les populations de ce pathogène à travers le monde afin d'évaluer et comparer leurs agressivités et tester en parallèle la résistance de différentes variétés créées dans le cadre de la lutte génétique contre le mildiou (Flier et *al.*, 2003 ; Andrivon et *al.*, 2007 ; Lehtinen et *al.*, 2009).

Depuis les épidémies de mildiou et les dégâts énormes enregistrés sur pomme de terre particulièrement durant la campagne agricole 2007-2008 (Rekad, 2009), des études préliminaires ont été effectuées à petite échelle pour identifier et caractériser les populations algériennes de *P. infestans* (Rekad, 2009 ; Beninal, 2009) mais les données obtenues restent insuffisantes et nécessitent d'être confirmées sur un grand nombre d'échantillons.

Cette étude consiste donc à caractériser les populations de *P. infestans* présentes dans la région nord-ouest d'Algérie durant la période 2008-2014 selon les paramètres suivants :

- Le type sexuel,
- L'effet des facteurs : milieu de culture, température, lumière et obscurité sur la croissance mycélienne et la sporulation de *P. infestans*,
- L'agressivité des isolats sur des variétés de pomme de terre et de tomate et l'évaluation du comportement variétal,
- La résistance des isolats au Métalaxyl (un fongicide largement utilisé en Algérie pour lutter contre le Mildiou).

#### **II-4.1 Détermination du type sexuel**

Le type sexuel de 161 isolats (Annexe 8) a été déterminé par une méthode de confrontation décrite par Shaw *et al.* (1985). Les isolats français, de type sexuel connu (P13-60 A1, P25-60A2), servent de référence. L'isolat de type sexuel inconnu est confronté séparément sur milieu de culture petits pois en boîtes de Pétri à deux isolats de référence d'origine française, l'un de type sexuel A1 et l'autre de type sexuel A2. L'observation à la loupe binoculaire de la production ou non d'oospores (organe attestant le croisement sexué) sur la zone de convergence des mycéliums (Figure 13) permet de déterminer le type sexuel de la souche inconnue.



**Fig. 13 :** Test de confrontation d'un isolat de *Phytophthora infestans* inconnu pour le type sexuel avec une souche de référence de type A1.

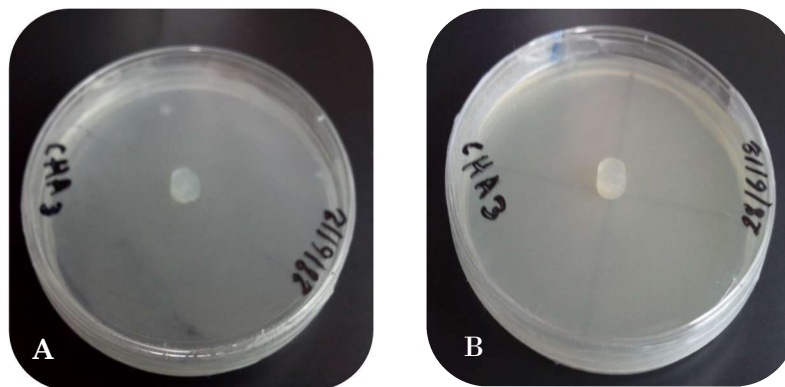
## II-4.2 Tests de l'effet de quelques facteurs sur la croissance mycélienne et la sporulation de *P. infestans*

### II-4.2.1 Test de l'effet de milieu de culture

Différents milieux de culture sont utilisés pour l'isolement et la culture de *P. infestans*. Dans cette étude nous avons testé deux milieux organiques, petit pois et pois chiche (Annexe 2) afin de sélectionner le plus favorable pour la croissance mycélienne et la sporulation de 8 isolats (CHA3, AM1P10, AM2P4, HMP3, SP4, MZP10, HMT7, ITCMI) pris au hasard.

- **Evaluation de la croissance mycélienne**

Un explant mycélien est prélevé pour chaque isolat à l'aide d'un emporte-pièce de 8 mm de diamètre à partir d'une jeune colonie âgée de 10 jours. L'explant est déposé avec le mycélium vers le bas, au centre d'une boîte de Pétri de 85 mm de diamètre contenant le milieu de culture (Figure 14). Trois répétitions sont retenues pour chaque isolat et chaque milieu de culture. Les boîtesensemencées sont mises en incubation à 20°C à l'obscurité. Les mesures diamétrales des colonies sont effectuées après 10 jours d'incubation selon deux directions perpendiculaires en faisant soustraire le diamètre de l'explant à chaque mesure.



**Fig. 14** : Un isolat de *P. infestans* repiqué sur deux milieux de cultures. **A** : sur milieu petit pois ; **B** : sur milieu pois chiche).

- **Evaluation de la sporulation**

La détermination de l'intensité de sporulation pour les 8 isolats, sur les deux milieux de culture, est effectuée à partir des cultures mycéliennes âgées de 10 jours. Les sporanges sont récupérées en versant 4 ml d'eau distillée dans chaque boîte et en raclant légèrement la surface de la colonie à l'aide d'une pipette Pasteur recourbée à la flamme (Figure 15A) de manière à ne pas détériorer la gélose. La suspension sporale est récupérée dans un petit

flacon et le dénombrement des sporanges est effectué en utilisant la cellule de Malassez (Annexe 7) avec deux mesures pour chaque échantillon.

#### **II-4.2.2 Test de l'effet de la lumière et de l'obscurité**

La croissance mycélienne et la sporulation pour les mêmes isolats décrits au test précédant sont évaluées sur milieu petit pois sous deux conditions : lumière et obscurité. Les boîtesensemencées sont incubées à 20°C, avec trois répétitions par isolat. Les mesures diamétrales des colonies sont effectuées après 10 jours d'incubation selon deux directions perpendiculaires en faisant soustraire le diamètre de l'explant à chaque mesure. La méthode utilisée pour évaluer la sporulation de chaque isolat est la même décrite dans le test précédent.

#### **II-4.2.3 Test de l'effet de la température sur la croissance mycélienne**

La croissance mycélienne est étudiée sur milieu petit pois selon 4 niveaux de températures (5°, 10, 20, et 25). Les 9 isolats utilisés (2 isolats collectés à partir de tomate : HMT7, CBT, et 7 isolats obtenus sur pomme de terre : CHA3, MNP4, MISSII, ADF, ARP1, ABD, ACT) pour ce test sont présentés en Annexe 8. La méthode utilisée est la même décrite dans les tests précédents. Après repiquage, les boîtes inoculées sont mises en incubation aux quatre températures étudiées et les mesures sont réalisées aussi comme précédemment.

#### **II-4.2.4 Analyse statistique**

Les résultats des tests de l'effet des facteurs, milieu de culture, lumière et obscurité et température sur la croissance mycélienne et la sporulation des isolats testés sont traités statistiquement. Des analyses de variance (ANOVA) sont effectuées en utilisant le logiciel SAS (Statistical Analysis System). Pour chacune des variables, croissance mycélienne et sporulation, les analyses permettent de déterminer s'il existe un effet significatif des isolats, du milieu de culture, de la lumière et de l'obscurité, ainsi que leurs interactions. Les variables pour lesquelles l'analyse de variance montre un effet significatif font l'objet d'une comparaison de moyenne de Student-Newman et Keuls, ce qui fournit un classement pour les caractères étudiés.

#### **II-4.3 Test d'agressivité des isolats sur folioles détachées**

L'agressivité constitue une composante très importante dans le pouvoir pathogène des isolats. Le test suivant permet de déterminer l'agressivité de 7 isolats de *P. infestans* (3 isolats collectés de pomme de terre et 4 isolats de tomate) (Annexe 8) sur des folioles détachées

(Andrivon et *al.*, 2003), de deux variétés de pomme de terre : Spunta et Sarpo Mira et une variété de tomate, Agora. Les différentes étapes de ce test sont présentées comme suit :

#### **II-4.3.1 Préparation de l'inoculum**

Afin de restituer le pouvoir pathogène des isolats conservés sur milieu de culture, une suspension de sporanges est d'abord préparée pour chaque isolat à partir des colonies en boîte. Les suspensions sont préparées à partir des cultures jeunes bien sporulées âgées de 2 à 3 semaines, en versant 2 ml d'eau distillée stérile par boîte. Ensuite, à l'aide d'une pipette pasteur recourbée à la flamme, on gratte légèrement la surface de la colonie pour récupérer les sporanges (Figure 15A). La suspension ainsi obtenue est versée dans un tube à hémolyse puis maintenue à 4°C pendant environ 2 heures pour promouvoir la libération des zoospores.

- **Prélèvement des folioles apicales pour la pré-inoculation**

Pour chacun des isolats à tester, nous avons prélevé 2 à 3 folioles apicales à l'aide d'un scalpel, sur les étages intermédiaires des plantes de pommes de terre (variété Spunta) âgées de 8 à 10 semaines. Les folioles sont ensuite déposées l'une à côté de l'autre, face inférieure vers le haut, dans le couvercle d'une boîte de Pétri renversée, contenant de l'eau gélosée à 1% (Annexe 3) pour éviter la dessiccation des folioles.

- **Pré- inoculation et incubation**

Pour chaque isolat, les folioles sont inoculées, chacune avec deux gouttes de 20 µl de la suspension de sporanges. Sur la première feuille, les gouttes sont déposées de manière directe et sur la deuxième, une légère blessure est préalablement infligée à la feuille avant le dépôt de chaque goutte (Figure 15B). La blessure sert à faciliter l'attaque d'un isolat ayant perdu son agressivité à cause de la culture en boîte. Les boîtes de Pétri contenant les folioles inoculées sont repérées (nom de l'isolat), puis rangées dans des boîtes en plastique transparentes et mises à incuber pendant 6 jours en chambre climatisée à 20<sup>0</sup> C. Après incubation, les folioles développent de grandes lésions suite à l'attaque de *P. infestans* (Figure 15C).

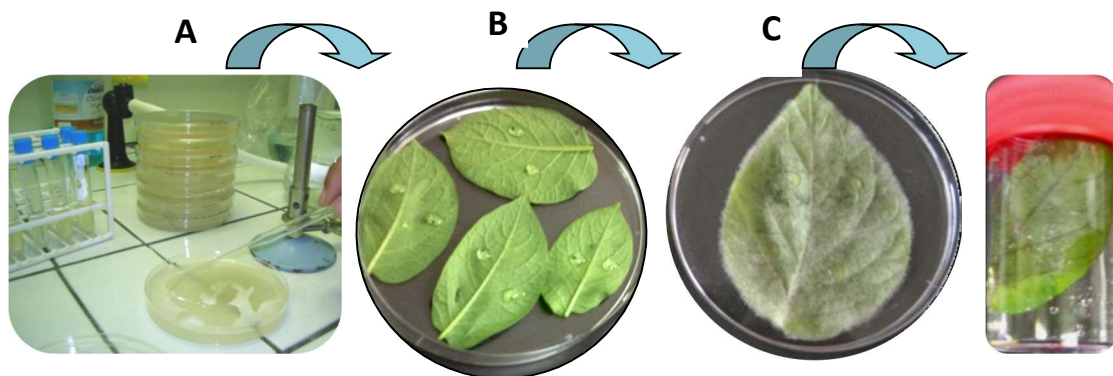
- **Préparation des suspensions de sporanges à partir des folioles inoculées**

Les folioles portant des lésions sont déposées ensuite dans des flacons et lavées soigneusement avec 4 ml d'eau distillée stérile afin de récupérer les sporanges (Figure 15C). A partir des suspensions obtenues, la concentration en sporanges est ensuite déterminée sous microscope à l'aide de la cellule de Malassez (Annexe 7), puis ajustée à 5.10<sup>4</sup> sporanges /ml. Les suspensions sont placées au réfrigérateur à 4<sup>0</sup>C pendant deux heures pour libérer les

zoospores des sporanges. Enfin la suspension obtenue constitue l'inoculum pour le test d'agressivité.

#### II-4.3.2 Inoculation des folioles des trois variétés et incubation

Des folioles axillaires au nombre de six par isolat sont prélevées sur l'étage intermédiaire de chaque plante (il est préférable de prendre des folioles jeunes, de taille similaire) des deux variétés de pomme de terre (Spunta et Sarpo Mira) et de la variété de tomate (Agora). Les folioles sont ensuite déposées dans les boîtes de Pétri, face inférieure vers le haut, dans le couvercle d'une boîte de Pétri renversée, contenant de l'eau gélosée à 1%. Les folioles des trois variétés (06 folioles par isolat et par variété) sont ensuite inoculées chacune par le dépôt d'une goutte de 20  $\mu$ L de la suspension du sporange (Figure 16). Ensuite les boîtes contenant les folioles inoculées sont mises en incubation dans une chambre climatisée à 20 °C pendant 7 jours.



**Fig. 15 :** Etapes de la préparation des suspensions sporales des isolats de *Phytophthora infestans*. **A :** préparation des suspensions sporales à partir des cultures mycéliennes des isolats ; **B :** pré-inoculation de la face inférieure des folioles de la variété Spunta avec des gouttes de la suspension de sporanges ; **C :** Préparation de suspension de sporanges par lavage d'une foliole portant des fructifications de *P. infestans* développées après inoculation. (Photo. : Rekad)



**Fig. 16 :** Inoculation de la face inférieure des folioles des trois variétés testées.

### **II-4.3.3 Mesure de l'agressivité des isolats**

L'agressivité est la composante quantitative du pouvoir pathogène, elle correspond à la quantité des symptômes (donc à la gravité de la maladie) causée par une souche donnée. Une forte agressivité peut se traduire par une apparition plus rapide de la maladie (taille de lésion), et/ou un taux de reproduction du parasite plus élevé (sporulation).

#### **Mesure de la taille des lésions :**

La taille des lésions développées sur les folioles de chaque variété, est déterminée, sept jours après l'incubation, par mesure du diamètre de la lésion. La surface de la lésion est calculée selon la formule suivante :  $\pi \times R^2$ , dont R est le diamètre moyen de la lésion.

#### **Mesure de la sporulation :**

Chaque foliole nécrosée est déposée dans un flacon de 45 ml de volume dans lequel sont introduits 4 ml d'eau distillée stérile, le tout est agité délicatement pendant environ 1 minute, afin de mettre en suspension la totalité des sporanges présentes sur la foliole. Les suspensions sont ensuite transférées dans un tube à hémolyse.

La concentration en sporocystes des suspensions obtenues est déterminée à l'aide de la cellule de Malassez ; trois répétitions ont été effectuées pour chaque interaction isolat x variété.

#### **Mesure de la capacité de sporulation :**

La capacité de sporulation de chaque isolat et sur chaque variété a été calculée comme le nombre de sporanges produits par  $\text{cm}^2$  de lésion.

### **II-4.3.4 Traitement des données et analyse statistique**

Les variables calculées :

- **La taille de la lésion** correspond à la surface nécrosée. Elle est exprimée en  $\text{cm}^2$ .
- **La sporulation par foliole** correspond au nombre total de sporanges produits par lésion sur chaque foliole. Elle est exprimée en nombre de sporanges /ml.
- **La capacité de sporulation** : A partir des deux variables précédentes, on calcule la capacité de sporulation qui représente le nombre total de sporanges produites par  $\text{cm}^2$

de lésion pour chaque foliole, c'est le rapport : production sporanges/taille de la lésion. La capacité de sporulation est étroitement liée à la dissémination de l'agent pathogène.

Les résultats des tests d'agressivité sont traités statistiquement. Des analyses de variance (ANOVA) sont effectuées en utilisant la procédure GLM (General Linear Model) du logiciel SAS (Statistical Analysis System). Pour chacune des variables (taille des lésions, nombre de spores par lésion, capacité de sporulation), les analyses permettent de déterminer s'il existe un effet significatif des isolats, des variétés, ainsi que de leurs interactions. Les variables pour lesquelles l'analyse de variance montre un effet significatif font l'objet d'une comparaison de moyenne de Student-Newman et Keuls, ce qui fournit un classement pour les caractères étudiés.

### **II.4.3 Test de résistance au métalaxyl**

L'évaluation de la résistance de 92 isolats au métalaxyl a été réalisée sur des disques foliaires de la variété Spunta selon la méthode décrite par Hermansen *et al.* (2000).

#### **II.4.3.1 Préparation de l'inoculum**

La suspension de sporanges est préparée pour chaque isolat à partir des colonies en boîte, comme dans le test d'agressivité.

#### **II.4.3.2 Préparation des disques foliaires et inoculation**

La capacité d'une souche de *P. infestans* à résister à un fongicide à base de métalaxyl (Ridomyl 25 WP, Novartis experimental compound) (Annexe 10) est évaluée sur des feuilles détachées de la variété Spunta mises en contact avec un gradient de concentration du fongicide (10 et 100 mg/l) et un témoin avec de l'eau distillée stérile.

- Pour chaque concentration nous avons utilisé quatre disques foliaires de 02 cm de diamètre découpés dans des feuilles de la variété Spunta. Les disques foliaires sont mis à flotter (face inférieure vers le haut) dans des boîtes de Pétri contenant la solution du fongicide ou de l'eau distillée stérile. Ensuite les disques foliaires sont inoculés avec 20 µl de la suspension de sporanges (Figure 17).

Deux boîtes sont préparées pour chaque souche et chaque concentration (avec 08 répétitions). Ensuite, les disques foliaires sont mis en incubation dans une chambre climatisée à une température variant entre 18-20 °C durant une période éclairée de 16 heures/jour et période obscure de 8 heures/jour, pendant 6 jours.

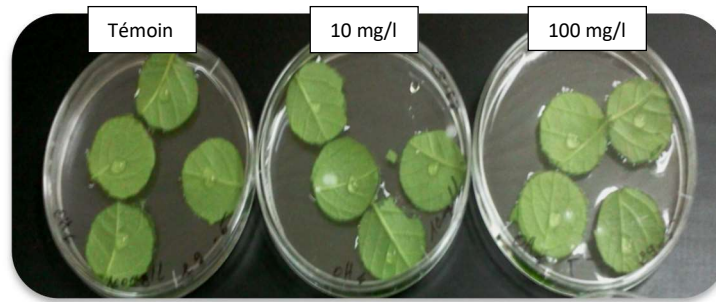


Fig. 17 : Disques foliaires inoculés chacun avec une goutte de 20  $\mu$ l de la suspension de sporanges.

**Lecture des résultats :**

- La souche est considérée comme résistante si elle se développe sur les disques foliaires pour les deux concentrations 10 et 100 mg/l de métalaxyl ;
- Elle est considérée comme sensible si elle se développe uniquement dans le témoin et pas dans les deux concentrations, 10 et 100 mg/l ;
- Enfin, elle a un statut de modérément résistante si elle se développe dans le témoin et la concentration 10 mg/l.

## II.5 Etude de la diversité génétique des isolats de *Phytophthora infestans* par les marqueurs microsatellites

La caractérisation des populations d'agents phytopathogènes provenant de différentes régions et le suivi de l'évolution de leurs structures dans le temps permettent de comprendre l'étiologie et l'épidémiologie des maladies et ainsi mettre une stratégie de lutte efficace contre ces bio-agresseurs. Les études antérieures effectuées sur la structure génétique des populations de *P. infestans* ont expliqué les changements observés sur la biologie de ce pathogène à travers le monde (Grünwald et Flier, 2005 ; Gomez-Alpizar et al., 2007). Ces études ont permis aussi de comprendre la dynamique des populations de *P. infestans* à travers plusieurs temps. Plusieurs efforts ont été déployés pour le suivi de ce pathogène à travers le monde ; des bases de données ont été créées, des workshops ont été organisés presque chaque année dans le cadre des réseaux Eucablight et Euroblight. L'objectif visé est de mettre une stratégie de lutte pour mieux contrôler cette maladie à caractère épidémique. Bien que les populations de *P. infestans* ont été bien étudiées en Europe (Montarry et al., 2010 ; Cooke et al., 2012, Paurson et al., 2015), en Amérique (Hu et al., 2012 ; Fry et al., 2013 ; Danies et al., 2014 ;) et dans d'autres régions de l'Asie (Chowdappa et al., 2013 ; Li et al., 2013), peu de

données sont disponibles sur la structure génétique des populations en Afrique. Le peu des travaux réalisés au Maroc (Sedegui et *al.*, 2000), en Tunisie (Harbaoui et *al.*, 2014), en Egypte (El Guanayni et *al.*, 2013) et dans quelques régions du sud d’Afrique (Pule et *al.*, 2012) n’ont pas été poursuivis. En Algérie quelques résultats ont été obtenus sur un nombre faible d’isolats (Corbière et *al.*, 2010 ; Corbière et *al.*, 2015) ce qui nécessite d’autres études plus approfondies afin de mieux comprendre les populations de *P. infestans* et ainsi contrôler les épidémies de mildiou enregistrées à chaque saison de culture. Pour déterminer la structure génétique des populations algériennes de *P. infestans*, nous avons choisi les marqueurs microsatellites qui ont une haute capacité discriminante, sont reproductibles, et sont fréquemment utilisés dans des études de génétique des populations.

L’objectif de la présente étude est donc d’analyser la structure génétique des populations de *P. infestans* présentes dans la région nord-ouest d’Algérie, d’étudier la répartition et l’évolution des génotypes identifiés durant la période 2008-2014, de comparer les populations du pathogène dans deux régions potentielles de production de pomme de terre.

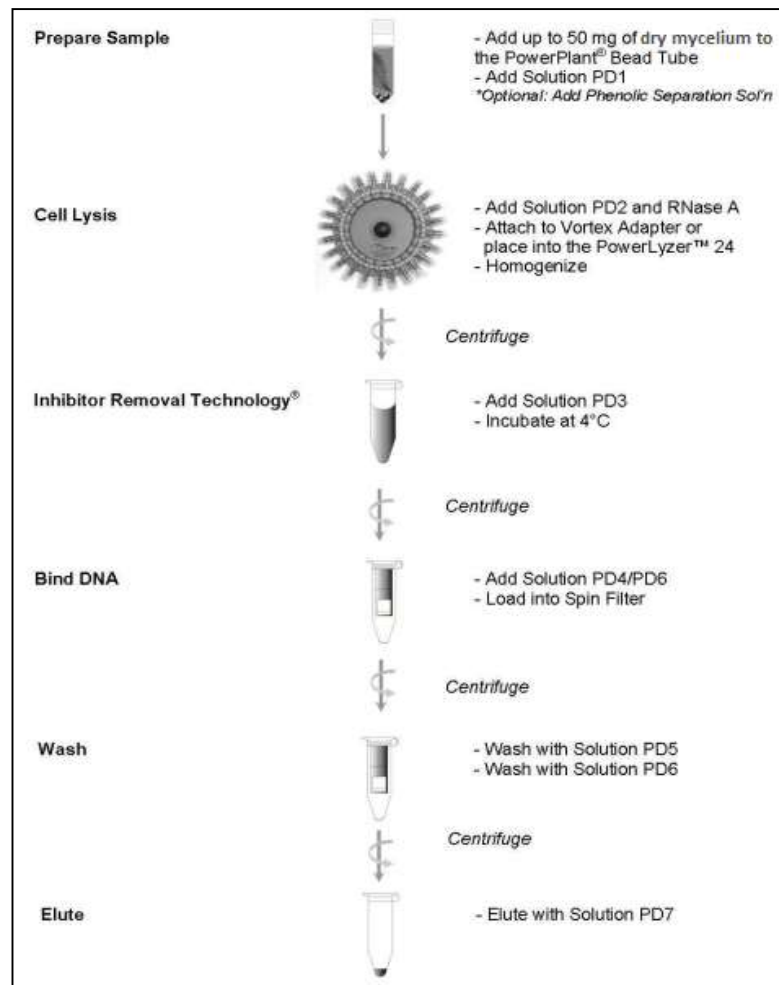
### **II.5.1 Obtention du mycélium**

137 isolats ont été sélectionnés (Annexe 9) pour l’étude de la diversité génétique de *P. infestans*. Après repiquage des isolats sur milieu petits pois solide et incubation pendant une semaine à 15°C, des explants mycéliens sont prélevés de l’extrémité des colonies développées et déposés dans des pots stériles de 80 ml de volume contenant 30 ml de milieu petits pois liquide (jus de petits pois stérilisé à 120°C pendant 20 mn). Deux pots sont préparés pour chaque isolat. Après 20 jours d’incubation à 15°C, le mycélium développé sous forme de voile à la surface du milieu est récupéré par filtrage, rincé avec de l’eau distillée stérile, et séché sur du papier absorbant stérile. Il est ensuite, conservé à – 20°C pour une utilisation ultérieure.

### **II.5.2 Extraction d’ADN**

L’ADN génomique de chaque isolat a été extrait à partir de 10-50 g de mycélium par l’utilisation de kit Power Plant Pro DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, USA) (Figure 18). L’extraction d’ADN comporte quatre étapes : la lyse des cellules du mycélium avec, l’élimination des protéines, l’élimination des autres acides nucléiques (ARN) et la concentration de l’ADN par précipitation à l’alcool.

Pour chaque isolat, 10-50 mg de mycélium sont placés dans un microtube stérile contenant des billes de verre. Ensuite, 450 µl du tampon d'extraction PD1 sont ajoutés avec 50 µl de la solution PD2 et 3 µl de la solution RNase A. Les tubes sont ensuite vortexés légèrement et incubés pendant 10 mn à 65°C. Après incubation, les tubes sont vortexés dans un PowerLyzer™ 24 pendant 2 mn à une vitesse maximale, pour l'homogénéisation du mélange, ensuite ils sont centrifugés pendant 2 mn à 13 000 rpm.



**Fig. 18** : Principales étapes d'extraction de l'ADN génomique des isolats de *P. infestans* selon le protocole du kit Power Plant Pro DNA Isolation utilisé.

Après centrifugation, le surnageant est transféré dans un nouveau tube propre de 2 ml puis mélangé avec 175 µl de la solution PD3 et vortexé pendant 5 sec ensuite incubé pendant 5 mn à 4°C. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 2 mn à 13 000 rpm puis 600 µl du surnageant sont transférés dans un nouveau tube de 2 ml. 600 µl de la solution PD4 et 600 µl de la solution PD6 sont ajoutés au surnageant et les tubes sont vortexés pendant 5 sec. 600 µl du mélange sont transférés dans un nouveau tube avec filtre (*Spin Filter*) puis centrifugés

pendant 30 sec à 10 000 rpm. Ensuite les tubes sont vidés en gardant le filtre puis 600 µl du surnageant sont ajoutés encore une fois à chaque tube et centrifugés pendant 30 sec à 10 000 rpm. Cette opération est répétée 3 fois jusqu'à l'épuisement du surnageant. 500 µl de la solution PD5 sont ajoutés au culot d'ADN présent dans les tubes. Ces derniers sont centrifugés pendant 30 sec à 10 000 rpm, puis vidés tout en gardant le filtre. La solution PD5 est un éthanol, elle est utilisée pour éliminer les impuretés et les résidus. 500 µl de la solution PD6 sont ajoutés au culot d'ADN puis les tubes sont centrifugés pendant 30 sec à 10 000 rpm, puis vidés tout en gardant le filtre. La solution PD6 est aussi un éthanol, utilisé pour terminer le lavage. Les tubes sont centrifugés encore une fois pendant 2 mn à 16 000 rpm afin d'éliminer les résidus de la solution PD6. Ensuite, les filtres sont enlevés et placés doucement dans de nouveaux tubes de 2 ml puis 50 µl de la solution PD7 (10 mM Tris, pH 8.0) sont ajoutés au centre du filtre pour chaque tube. Après incubation pendant 2 mn à température ambiante, les tubes sont centrifugés deux fois pendant 30 sec à 10 000 rpm. A la fin de l'opération, les filtres sont enlevés et l'ADN obtenu dans le tube est quantifié. La quantité des échantillons d'ADN est évaluée par l'utilisation de kit DNA Quant-it assay (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) et la qualité de l'extraction est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant SYBR® Safe (Invitrogen, Life Technologies, USA). Les échantillons d'ADN sont ensuite stockés à -20 °C jusqu'à leur utilisation pour l'amplification des microsatellites.

### **II.5.3 Amplification des microsatellites**

L'amplification des douze microsatellites (Pi02, Pi4B, G11, Pi04, Pi63, Pi70, D13, SSR2, SSR4, SSR6, SSR8 et SSR11) décrits par Li et *al.* (2013) a été réalisée en utilisant un kit PCR multiplex QIAGEN Type-it Microsatellite PCR Kit (QIAGEN, Cat. No. 206243). Les réactions d'amplification ont été effectuées suivant le protocole du fabricant mais avec un volume réactionnel réduit à 12,5 µl. Les amplifications comportent un préchauffage à 95°C pendant 5 min, suivi par 28 cycles comprenant 30 secondes de dénaturation à 95 °C, 90 secondes à 58°C, et 20 secondes à 72°C. Les amplifications ont été achevées par une extension finale à 60°C pendant 30 minutes. Pour l'analyse ABI3730, les produits PCR ont été dilués 100 fois et 0,6 µl du produit SSR dilué a été ajouté à 10.2 µl prélevé d'un mélange de deionised formamide (Hi-Di Formamide Part no. 4311320, Applied Biosystems) et GeneScan-500LIZ standard (Part no. 4322682, Applied Biosystems). Le mélange comprend

1ml de HiDi et 6 µl GeneScan-500LIZ standard (suffisant pour 96 échantillons). Les échantillons ont été analysés par l'utilisation de ABI 3730 capillary DNA sequencer selon le protocole (Applied Biosystems). La taille des allèles SSR a été déterminée et marquée en utilisant GeneMapper v3.7 software (Applied Biosystems).

#### **II.5.4 Analyses des données**

L'analyse de la diversité génétique a été effectuée uniquement pour les isolats dont le profil haplotypique des 12 microsatellites est complet. La diversité génétique a été analysée selon la fréquence allélique, le nombre des allèles par *locus* et l'indice de diversité. Ces statistiques basiques ont été déterminées en se basant sur les données SSR, par programmation sous Matlab. L'indice de diversité (H) a été calculé pour chaque *locus* selon la formule suivante (Anderson *et al.*, 1993).

$$H = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

où  $k$  est le nombre total des allèles détectés par un marqueur SSR,  $p_i$  est la somme des fréquences alléliques pour chaque *locus*.

Notons que la diversité est nulle lorsque la valeur du H égale à 0 et elle est maximale lorsque H égale à 1. Afin de montrer la relation entre les génotypes de *P. infestans* identifiés, un dendrogramme est réalisé par la méthode UPGMA en utilisant les coefficients Jaccard sous Matlab.

CHAPITRE

3

# Résultats et discussions

---

## Chapitre III

# Résultats et discussions

### III-1 Résultats

#### III-1.1 Isolement et identification de l'agent pathogène

Plus de 400 isolats ont été collectés durant la période 2008-2014. Nous avons pu conserver que 161 isolats et la plupart des isolats ont été perdus suite aux contaminations. Les 161 isolats (146 isolats pomme de terre et 15 isolats tomate) ont été testés pour le type sexuel, 92 pour la résistance au métalaxyl et 137 ont été analysés par SSR (Tableau 2).

Vu l'hétérogénéité et le nombre faible d'échantillons conservés durant les premières années d'étude par rapport aux deux dernières années, 2013 et 2014, nous avons considéré les années : 2008, 2010, 2011 et 2012 comme une seule période (2008-2012) lors de l'analyse des résultats.

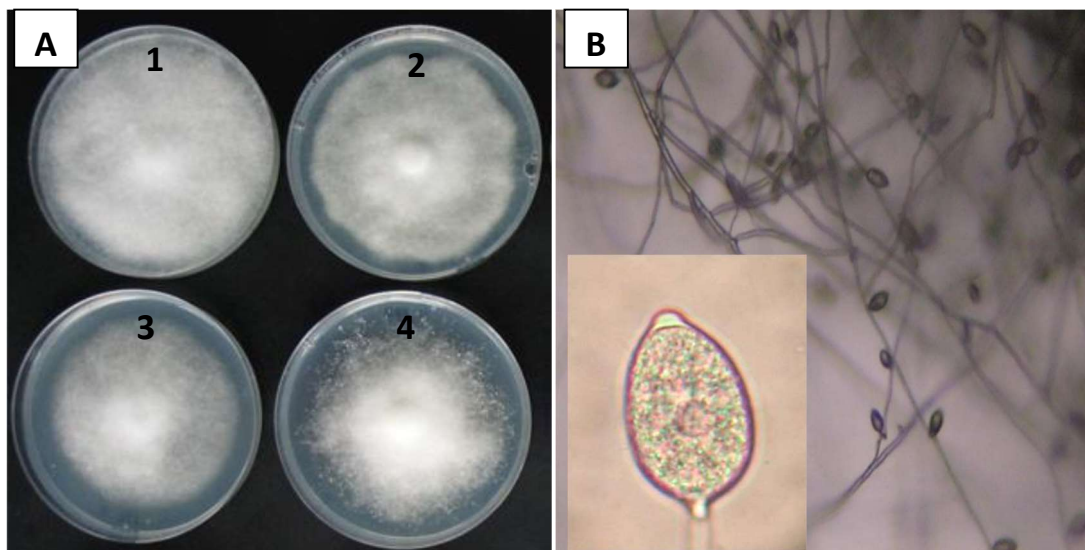
**Tableau 2** : Nombre des isolats obtenus par année

Année du prélèvement	Nombre des isolats								
	Metalaxyl					Génotypes identifiés			
	A1	A2	Sensible	Intermédiaire	Resistant	13_A2	2_A1	23_A1	Misc
2008-2012	19	26	5	2	19	4	10	0	8
2013	10	53	1	0	24	48	3	1	3
2014	21	32	0	2	39	26	12	5	0
Total	50	111	6	4	82	78	25	6	11

Les repiquages des isolats obtenus sur milieu petit pois nous ont permis de distinguer quatre morphotypes de *Phytophthora infestans* (Figure 19A).

- Morphotype 1 (Figure 19A1) : la colonie est dense et possède une bordure souvent diffuse. Le mycélium aérien est très abondant et occupe presque la totalité de la surface de la boîte de Pétri;
- Morphotype 2 (Figure 19A2) : la colonie ne se distingue de celle du morphotype 1 que par un mycélium moins dense qui se développe même dans le milieu de culture ;
- Morphotype 3 (Figure 19A3) : la colonie est peu dense ; son contour est souvent net et le mycélium aérien est peu développé ;
- Morphotype 4 (Figure 19A4) : caractérisé par un mycélium aérien moins abondant et une croissance en forme de bouquets.

L'observation microscopique des colonies obtenues en comparaison avec une souche de références de *Phytophthora infestans* a permis d'identifier les isolats obtenus. Ces derniers sont caractérisés par la présence de sporanges en forme de citron et un mycélium non cloisonné (Figure 19B), formes caractéristiques de l'espèce *P. infestans*.



**Fig. 19** : Aspect des cultures de quelques isolats de *Phytophthora infestans* sur milieu petits pois (A) ; Sporangies et mycélium de *P. infestans* observés sous microscope (grossissements 40 et 4, respectivement (B)). Photographie : Rekad.

### III-1.2 Détermination du type sexuel

Le test de confrontation a révélé l'existence des deux types sexuels A1 et A2 au sein des populations de *P. infestans* dans la zone d'étude. 70% (n=112) des isolats ont été de type A2 et 30% de type A1 (n=49). Le rapport A1/A2 a été de 0.4:0.6 durant la période 2008-2012, 0.15:0.85 en 2013 et 0.4:0.6 en 2014. La plupart des isolats collectés de tomate ont été de type A1 sauf un isolat (BT16)

été de type A2, collecté en 2013 dans la wilaya de Mostaganem. 24 % des isolats collectés de pomme de terre ont été de type A1 et 76% de type A2. Les isolats de type A2 ont été les plus dominants sur pomme de terre durant toute la période d'études (Figure 20). Les deux types sexuels ont été détectés quelques fois dans la même parcelle au niveau des deux régions d'étude, Mostaganem et Ain Defla. Un taux élevé de type A2 a été enregistré dans les isolats collectés de la région de Ain Defla avec un rapport de 0.1:0.87 (A1:A2). Par contre, les fréquences des deux types sexuels ont été proches au sein des isolats collectés à Mostaganem avec un rapport A1/A2 de 0.45:0.54 (Figure 21).

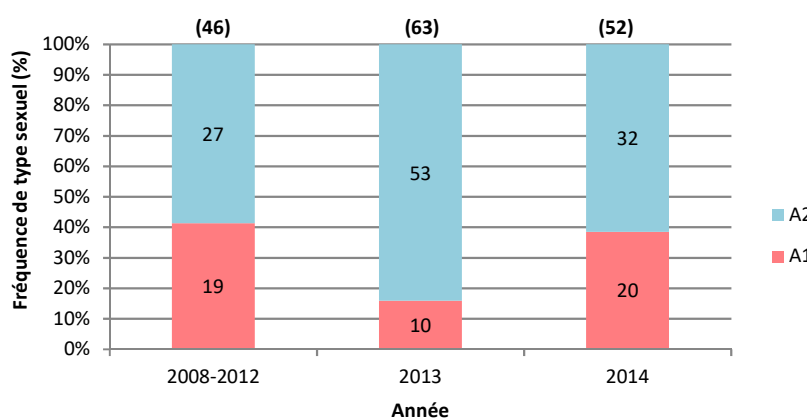


Fig. 20 : Fréquences des types sexuels, A1 et A2 dans le nord-ouest algérien durant la période 2008-2014.

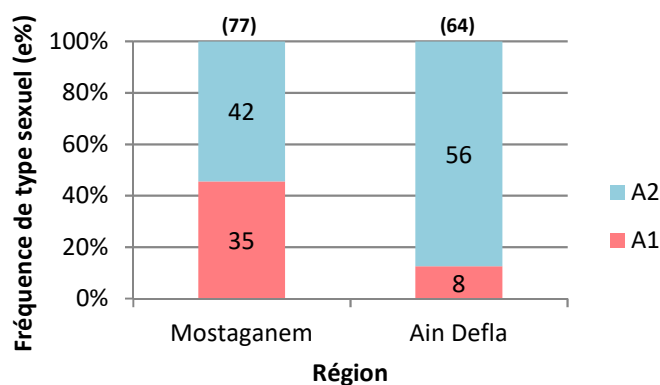


Fig. 21 : Fréquences des types sexuels, A1 et A2 dans les populations de *Phytophthora infestans* collectée de deux régions (Mostaganem et Ain Defla) dans le nord-ouest algérien.

### III-1.3 Effet de quelques facteurs sur la croissance mycélienne et la sporulation des isolats

#### III-1.3.1 L'effet de milieu de culture

- **Sur la croissance mycélienne**

La croissance mycélienne de 8 isolats a été évaluée sur deux milieux de culture, petit pois et pois chiche après 10 jours d'incubation en mesurant le diamètre des colonies. Les résultats

présentés sur les figures, 22 et 23 montrent que tous les isolats testés se développent bien sur les deux milieux de cultures mais avec divers degrés.

La Figure 23 montre que les deux milieux de cultures ont permis une bonne croissance mycélienne pour l'ensemble des isolats étudiés. Sur le milieu petit pois le diamètre des colonies développées par les différents isolats varie entre 20 à 65 mm et sur le milieu pois chiche de 18 à 57 mm.

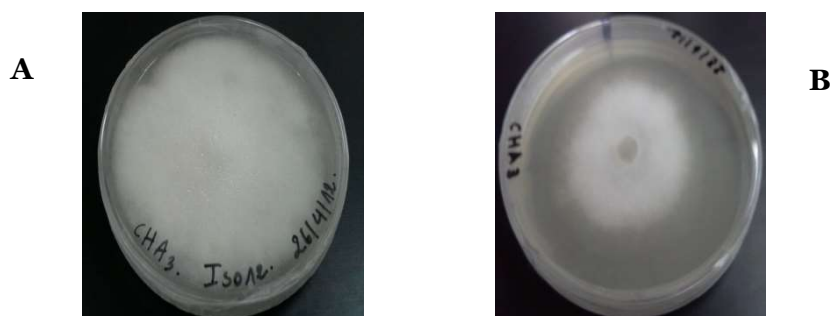


Fig. 22 : Cultures mycéliennes d'un isolat de *Phytophthora infestans* sur deux milieux de cultures. (A) : Sur milieu petit pois ; (B) : Sur milieu pois chiche.

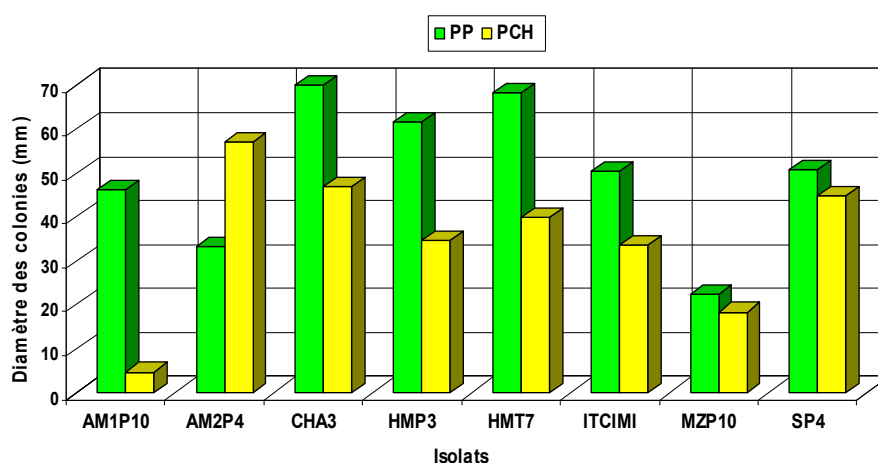


Fig. 23 : Croissance mycélienne des isolats de *Phytophthora infestans* sur deux milieux de cultures, petit pois (PP) et pois chiche (PCH) après 10 jours d'incubation à 20°C.

L'analyse de variance des résultats de la croissance mycélienne montre que la différence est non significative pour le facteur milieux de culture ( $F = 2,07$ ,  $p < 0,1780$ ), entre les isolats ( $F = 2,33$ ,  $p < 0,1016$ ) et pour l'interaction milieu x isolat ( $F = 2,03$ ,  $p < 0,1467$ ). Toutefois l'effet milieux, l'effet isolat et l'interaction sont presque identiques.

Le test de Student-Newman et Keuls, au seuil de 5% permet de classer les isolats selon le diamètre moyen des colonies dans un seul groupe homogène (Tableau 3).

**Tableau 3** : classement des isolats selon le diamètre moyen des colonies, après 10 jours d'incubation sur deux milieux de culture.

Groupes	Intervalles des diamètres moyens (en mm)	Isolats
A	19,50 - 64	HMT7, CHA3, SP4, HMP3, ITCMI, AM2P4, AM1P10, MZP1

Pour le facteur milieu de culture, le test de Student-Newman et Keuls, au seuil 5% permet de classer les milieux de cultures selon le diamètre moyen des colonies dans un seul groupe homogène (Tableau 4) :

**Tableau 4** : Classement des milieux de culture selon le diamètre moyen des colonies après 10 jours d'incubation.

Groupes	Intervalles des diamètres moyens (en mm)	Milieux de culture
A	34,417 - 42,857	PP, PCH

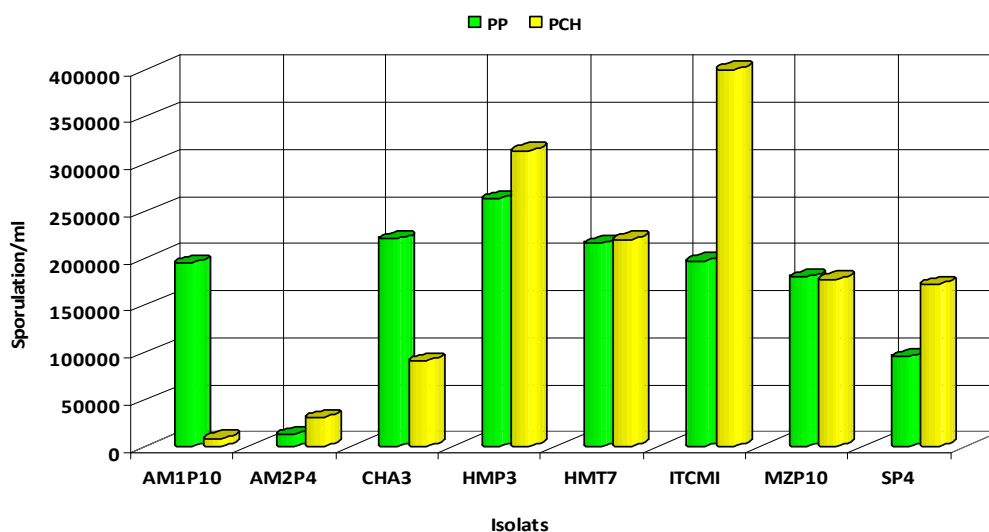
- **Sur la sporulation**

Cette étude a été réalisée sur les mêmes isolats utilisés dans le test précédent. La sporulation a été déterminée sur des colonies ayant poussé sur les deux milieux de culture, petite pois et pois chiche pendant 10 jours d'incubation à 20°C.

La Figure 24 montre que la majorité des isolats produisent des spores sur les deux milieux testés. Mais la sporulation diffère d'un isolat à l'autre. Sur le milieu petit pois la sporulation produite par les différents isolats varie de 12666.666 à 262666.667 spores par ml, tandis que sur le milieu pois chiche la sporulation produite varie de 30666.667 à 402000 spores par ml.

L'isolat ITCMI produit plus de sporanges sur milieu pois chiche que sur milieu petit pois, contrairement à l'isolat AM1P10 qui sporule beaucoup plus sur le milieu petit pois. La sporulation de l'isolat AM2P4 est la plus faible par rapport aux autres isolats et ceci pour les deux milieux de culture.

L'analyse de la variance des résultats pour la variable, sporulation montre une différence significative pour le facteur isolat ( $F = 5,69$ ,  $p < 0,0002$ ) et pour l'interaction isolat x milieu ( $F = 2,39$ ,  $p < 0,0441$ ), mais pas de différence significative pour le facteur milieu ( $F = 0,03$ ,  $p < 0,8649$ ). Donc l'effet isolat est plus fort que l'effet milieu qui s'est montré plus faible.



**Fig. 24 :** Sporulation des isolats de *Phytophthora infestans* sur deux milieux de culture, petit pois et pois chiche après 10 jours d'incubation à 20°C.

Le test de Student-Newman et Keuls, au seuil de 5% permet de classer les isolats en 5 groupes :

- Le groupe A contient les isolats (ITCMI et HMP3) dont la sporulation moyenne comprise entre 288000 et 299000 sporanges/ml.
- Le groupe B englobe un seul isolat (HMT7) dont la sporulation moyenne est de 217000 sporanges/ml.
- Le groupe C rassemble des isolats (SP4, MZP10 et CHA3) dont la sporulation varie entre 133000 et 178000 sporanges/ml.
- Le groupe D est constitué par un isolat (AM1P10). La sporulation moyenne est de 101000 sporanges/ml.
- Le groupe E comprend un seul isolat (AM2P4) dont la sporulation moyenne est de 21667 sporanges/ml.

Pour les deux milieux de cultures, l'analyse de la variance montre qu'il n'y a pas une différence significative sur la sporulation. Le test de Student-Newman et Keuls, au seuil de 5% permet de classer les milieux de culture selon la sporulation moyenne des isolats dans un seul groupe homogène (Tableau 5) :

**Tableau 5 :** Classement des milieux de culture selon la sporulation moyenne des isolats, après 10 jours d'incubation.

Groupes	Intervalles de sporulation moyenne (en mm)	Milieux de cultures
A	172000-176000	PP, PCH

### **III-1.3.2 L'effet de la lumière et de l'obscurité**

- **Sur la croissance mycélienne**

La croissance mycélienne de 8 isolats a été évaluée en mesurant le diamètre des colonies développées sur milieu petit pois après 10 jours d'incubation à la lumière et à l'obscurité (à 20°C).

Les résultats présentés sur la figure 25 montrent que les isolats testés se développent dans les deux conditions, lumière et obscurité, mais la croissance mycélienne est plus importante à l'obscurité qu'à la lumière.

La figure 25 illustre la distribution des isolats selon le diamètre des colonies développées sur le milieu petit pois à la lumière et à l'obscurité. Cette figure montre que le diamètre des colonies est plus important à l'obscurité et varie selon les isolats de 22,33 à 70,66 mm. La croissance est moins importante à la lumière, avec un diamètre entre 14,83 et 50,83 mm.

L'analyse de la variance des résultats de la croissance mycélienne montre une différence hautement significative pour le facteur lumière ( $F = 46,52$ ,  $p < 0,0001$ ), entre les isolats ( $F = 7,89$ ,  $p < 0,0001$ ) et différence significative pour l'interaction lumière\*isolats ( $F = 2,97$ ,  $p < 0,0215$ ).

Le test de Student-Newman et Keuls, au seuil de 5% permet de classer les isolats en 4 groupes :

- Le premier groupe rassemble 3 isolats (CHA3, HMT7, et HMP3). Ceux-ci peuvent développer des colonies de diamètre allant de 51 à 55 mm.
- Le deuxième groupe comprend 2 isolats (ITCMI et SP4). Les colonies mycéliennes de ces derniers ont des diamètres compris entre 43,25 à 43,25 mm, respectivement.
- Le troisième groupe contient 1 isolat (MZP10) dont le diamètre moyen est de 24,50 mm.
- Le quatrième groupe englobe deux isolats (AM1P10 et AM2P4), dont le diamètre moyen est de 19,75 et 20,66 mm, respectivement.

L'analyse de variance des résultats obtenus a révélé une différence significative entre la lumière et l'obscurité pour la variable croissance mycélienne. Le test de Student-Newman et Keuls, au seuil de 5% permet de classer les deux facteurs en 2 groupes (Tableau 6).

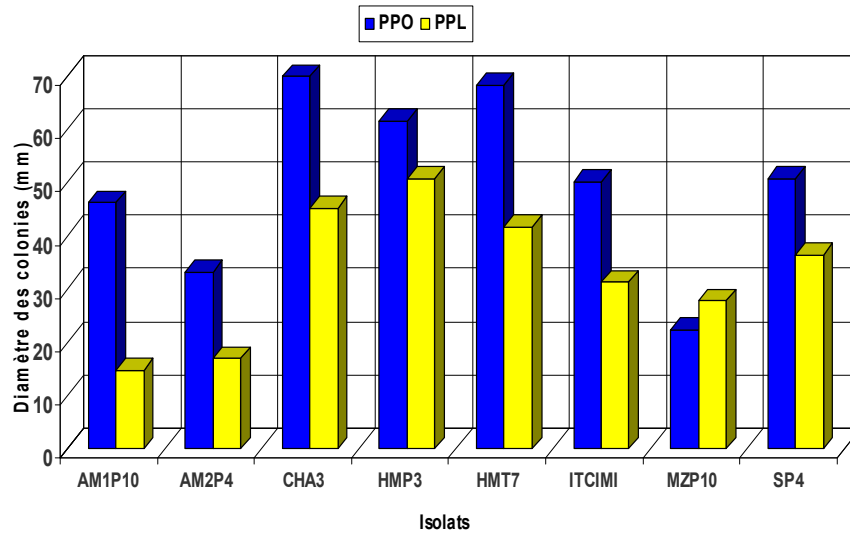


Fig. 25 : Croissance mycélienne des différents isolats à la lumière (PPL) et à l'obscurité (PPO) après 10 jours d'incubation à 20°C.

Tableau 6 : Classement des facteurs, lumière et obscurité en groupes, selon le diamètre moyen des colonies développées par les isolats étudiés.

Groupes	Diamètres moyens (en mm)	Milieus
A	46,58	Obscurité
B	27,33	Lumière

• Sur la sporulation

La sporulation des isolats a été déterminée sur des colonies ayant poussé sur les deux milieux, petit pois et pois chiche pendant 10 jours d'incubation à la lumière et à l'obscurité (à 20°C). La figure 26 montre les résultats de la sporulation pour chaque isolat.

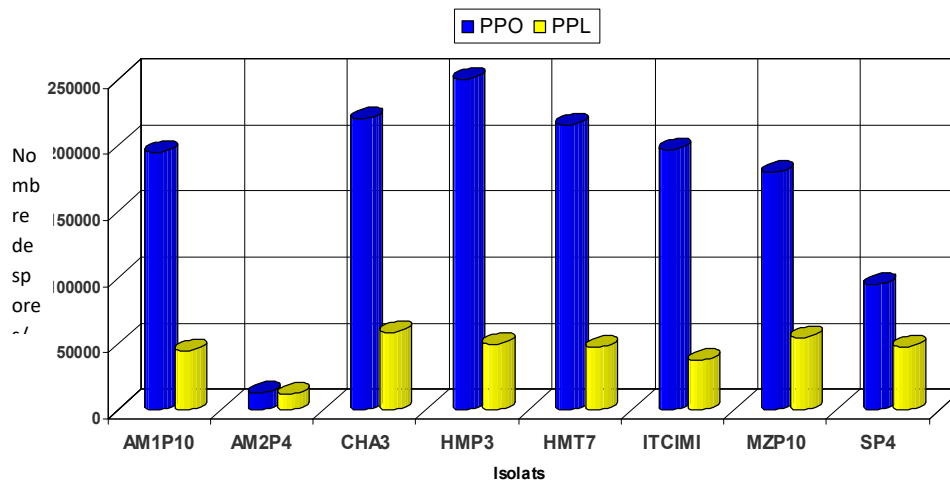


Fig. 26 : Sporulation des différents isolats après 10 jours d'incubation à lumière et à l'obscurité.

La figure 26 montre que la majorité des isolats produisent des sporanges que ce soit à la lumière ou à l'obscurité. Mais la sporulation est plus importante à l'obscurité qu'à la lumière. Ceci pour l'ensemble des isolats étudiés sauf l'isolat AM2P4 dont la sporulation est presque la même sous les deux conditions, lumière et obscurité.

L'analyse de la variance des résultats de la sporulation a révélé une différence hautement significative pour le facteur lumière ( $F = 88,49$ ,  $p < 0,0001$ ), entre les isolats ( $F = 5,66$ ,  $p < 0,0003$ ), et pour l'interaction lumière\*isolats ( $F = 3,30$ ,  $p < 0,0093$ ). Le test de Student-Newman-Keuls au seuil 5% permet de classer les isolats selon la sporulation moyenne en deux groupes (Tableau 7) :

- Le premier groupe contient 7 isolats qui produisent le plus grand nombre de sporanges. La sporulation moyenne pour ce groupe est comprise entre 71000 à 156000 sporanges/ml.
- Le deuxième groupe comprend un seul isolat qui produit le plus faible nombre de sporanges (12333 sporange/ml).

**Tableau 7 :** Classement des isolats en groupes, selon la sporulation moyenne à la lumière et à l'obscurité.

Groupes	Intervalle de la sporulation moyenne (Sporanges/ml)	Isolats
A	156333- 71333	HMP3, CHA3, HMT7, AM1P10, ITCMI, MZP10, SP4
B	12333	AM2P4

L'analyse de la variance des résultats de la sporulation pour le facteur lumière a révélé une différence significative entre le milieu petit pois à la lumière et à l'obscurité.

Le test de Student-Newman et Keuls au seuil de 5% permet de classer les deux facteurs en deux groupes (Tableau 8)

**Tableau 8 :** Classement des facteurs, lumière et obscurité en groupes selon la sporulation moyenne des isolats étudiés.

Groupes	Sporulation moyenne (sporanges/ml)	Facteurs
A	172000	Obscurité
B	44083	Lumière

### III-1.3.3 L'effet de la température sur la croissance mycélienne

La croissance mycélienne de 9 isolats a été évaluée sur milieu petit pois selon 4 niveaux de températures (5, 10, 20, 25°C), en mesurant le diamètre des colonies après 10 jours d'incubation.

La figure 27 montre que tous les isolats testés se développent bien dans l'intervalle de température de 10 à 20°C. Aux températures supérieures à 10°C, la croissance mycélienne augmente rapidement, atteignant son maximum à 20°C, alors que la croissance mycélienne aux deux températures extrêmes 5°C et 25°C est fortement ralentie et faible.

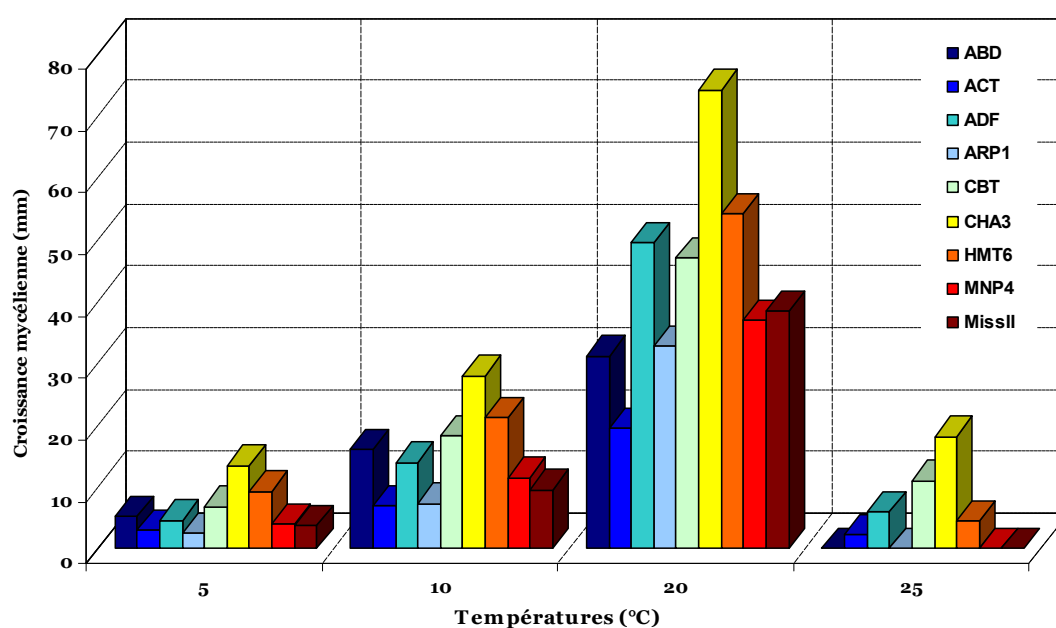


Fig. 27 : Croissance mycélienne des isolats de *Phytophthora infestans* après 10 jours d'incubation à différentes températures.

D'après la figure 27, il apparaît clairement que l'optimum thermique pour les isolats testés s'établit à 20°C. L'analyse de la variance des résultats de la croissance mycélienne montre une différence hautement significative pour le facteur température ( $F = 551.74$ ,  $p < 0,0001$ ), entre les isolats ( $F = 47.51$ ,  $p < 0,0001$ ), et pour l'interaction température\*isolat ( $F = 7,11$ ,  $p < 0,0001$ ). Toute fois l'effet températures est supérieur à l'effet isolat qui est lui-même plus fort que l'interaction.

Le test de Student-Newman et Keuls, au seuil de 5% permet de classer les températures selon le diamètre moyen des colonies en 3 groupes :

- Le premier groupe contient la température 20°C. A cette température la croissance mycélienne est forte et les isolats développent des colonies dans le diamètre moyen est de 42.63 mm.
- Le deuxième groupe comprend la température 10°C dont la croissance mycélienne des isolats est moyenne avec un diamètre moyen de 14,76 mm.
- Le troisième groupe rassemble deux températures, 5 et 25°C. dont la croissance mycélienne est très faible avec des diamètres moyens compris entre 4,66 et 5,87 mm, respectivement.

L'analyse de variance des résultats de la croissance mycélienne a montré une différence significative entre les isolats étudiés.

Le test de Student-Newman et Keuls, au seuil 5% permet de classer les isolats en cinq groupes (Tableau 9).

**Tableau 9 :** Classement des isolats en groupes, selon le diamètre moyen des colonies, après 10 jours d'incubation à quatre températures (5, 10, 20, et 25°C).

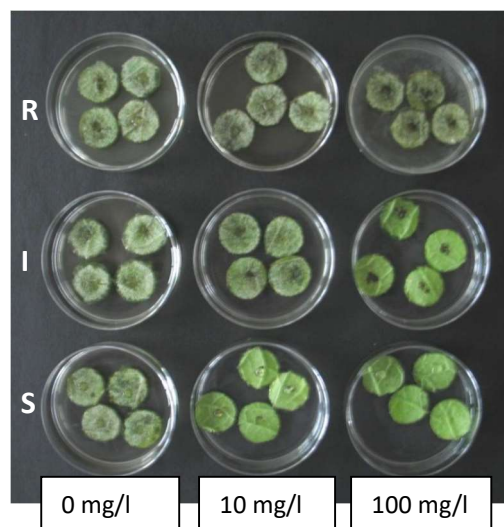
Groupes	Intervalles des diamètres moyens (en mm)	Isolats
A	33,46	CHA3
B	18,54- 22,29	ADF, CBT, HMT7
C	12,91- 13,12	MissII, ABD, MNP4
D	10,66	ARP1
E	7,96	ACT

- Le groupe A contient un seul isolat CHA3 qui présente la plus grande croissance quel que soit la température.
- Le groupe B rassemble 3 isolats, HMT7, CBT, ADF qui poussent plus aux températures 10 et 20°C par rapport aux autres températures 5 et 10°C.
- Le groupe C englobe 3 isolats, MNP4, ABD, MissII qui développent des diamètres moyens aux deux températures 10 et 20°C. A la température 5°C, leur croissance est faible et à 25°C elle est nulle.
- Le groupe D comprend un seul isolat, ARP1 qui développe un diamètre moyen à la température 20°C. alors qu'aux températures 5 et 10°C il présente des diamètres plus faibles, par contre la croissance est nulle à la température 25°C

▪ Le groupe E est constitué par l'isolat ACT qui développe un diamètre moyen faible à la température 20°C, tandis que la croissance mycélienne est plus faible aux autres températures.

### III-1.4 Test de résistance des isolats au métalaxyl

Parmi les 92 isolats testés pour leur résistance au métalaxyl, 89% (n=82) ont été classés comme résistants, 7% (n=6) comme sensibles et 4% (n=4) comme intermédiaires (Figure 28). Le phénotype résistant a été le plus dominant durant la période d'étude (Figure 29). 73% (n=19) des isolats testés durant 2008-2012 ont été résistants, 19%, (n=5) sensibles et 8% (n=2) intermédiaires. En 2013 et 2014, les proportions des isolats résistants ont été presque similaires, 96% (n=24) et 95% (n=39), respectivement. Les isolats des deux types sexuels, A1 et A2 se sont révélés résistants mais avec une fréquence plus élevée chez le type A2 (Figure 30). Un taux élevé d'isolats résistants a été trouvé dans les deux régions Mostaganem et Ain Defla, 93% (n=42) et 86% (n=32), respectivement (Figure 31).



**Fig. 28 :** Résultats du test de résistance au métalaxyl de 3 isolats de *P. infestans*. **R :** Résistant ; **I :** Intermédiaire ; **S :** Sensible. (Photographie : Rekad)

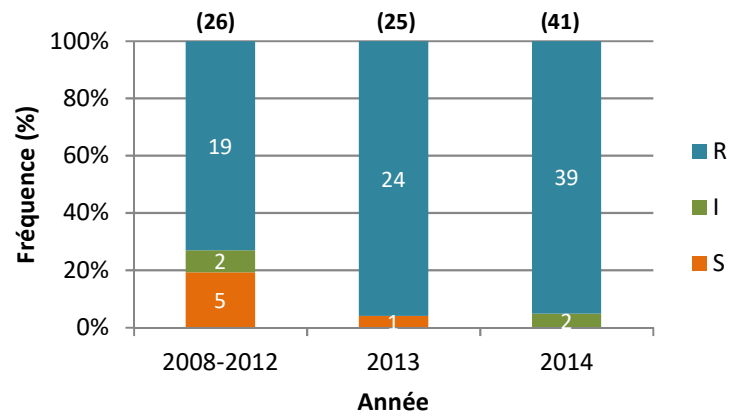


Fig. 29 : Résistance au métalaxyl des isolats de *Phytophthora infestans* dans la région nord-ouest d'Algérie pour la période 2008-2014.

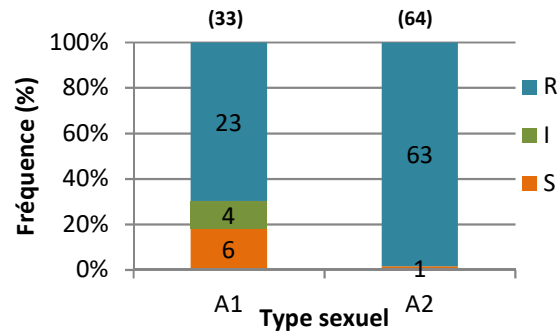


Fig. 30 : Résistance au métalaxyl des isolats de *Phytophthora infestans* par rapport au type sexuel.

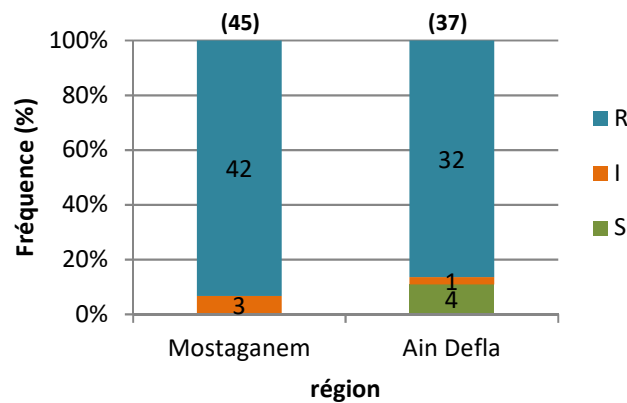


Fig. 31 : Résistance au métalaxyl des isolats de *Phytophthora infestans* collectés dans deux région, Mostaganem et Ain Defla.

### III.1.5 Test d'agressivité des isolats sur les différentes variétés

Cette étude vise à comparer l'agressivité de 7 isolats (3 isolats issus de la pomme de terre et 4 isolats issus de la tomate) sur 2 variétés de pomme de terre (Spunta et Sarpo Mira) et une variété de tomate (Agora) et tester par la suite le comportement des trois variétés vis-à-vis des isolats de *P. infestans*.

Pour cela une analyse de variance a été réalisée au seuil 5% sur les trois variables étudiées qui sont trois composantes de l'agressivité, à savoir la taille de lésion, la sporulation par lésion et la capacité de sporulation par cm<sup>2</sup> de lésion.

#### III-1.5.1 Taille des lésions

La majorité des isolats prélevés des deux hôtes ont provoqué des lésions sur les différentes variétés testées (Figures, 32 et 33). La figure 34, présente la distribution des isolats selon la taille des lésions développées sur chacune des variétés testées, après 7 jours d'inoculation à 20°C. Elle montre que les surfaces des lésions sont variables selon les isolats et les cultivars testés.

Sur Spunta les lésions manifestées sont plus importantes, variant de 2,5 à 12,36 cm<sup>2</sup>, surtout pour les isolats issus de la pomme de terre (ARP1 et CHA4), tandis que les isolats issus de la tomate (CBT, HMT7, HMT8, ITCMI) ont développé des lésions intermédiaires et relativement comparables. Sur Agora la taille des lésions formées par les isolats varie de 4,74 à 16,5 cm<sup>2</sup>, elle est significativement plus grande pour les isolats issus de la tomate par rapport aux isolats issus de la pomme de terre.



**Fig. 32** : Diversité des lésions causées par un isolat issu de pomme de terre sur les folioles des 3 variétés testées. (A) : Agora. (B) : Spunta. (C) : Sarpo Mira.



Fig. 33 : Diversité des lésions causées par un isolat issu de tomate sur les folioles des 3 variétés testées. (A) : Agora ; (B) : Spunta ; (C) : Sarpomira.

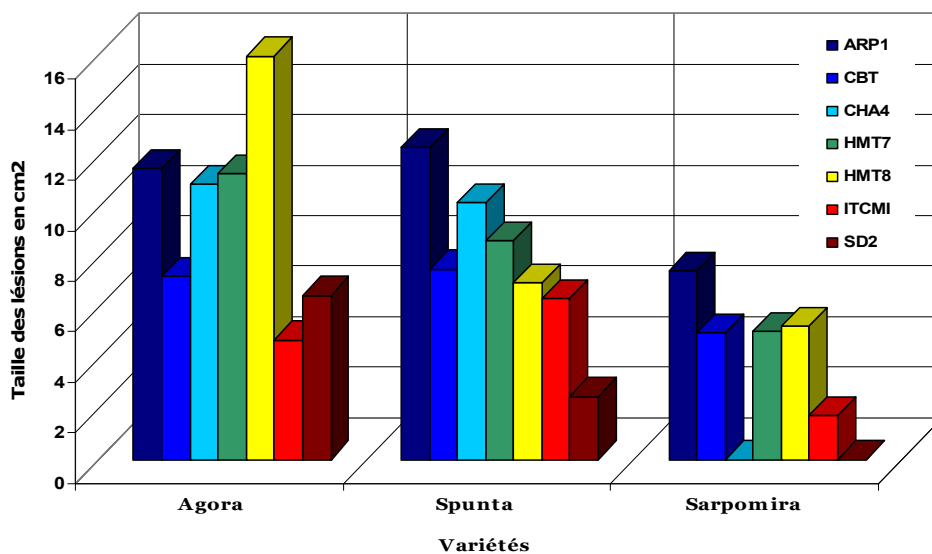


Fig. 34. : Taille des lésions provoquées par les isolats de *Phytophthora infestans* testés sur les différentes variétés.

Inversement, les tailles des lésions provoquées par les différents isolats sur Sarpomira sont les plus faibles allant de 1,75 à 7,47 cm<sup>2</sup>. De plus, chacun des isolats donne des lésions de taille différente, selon la variété. Il s'agit d'une distribution hétérogène illustrant la variabilité du comportement des isolats vis-à-vis des différentes variétés.

L'analyse de variance des résultats d'agressivité pour la variable taille des lésions révèle une différence hautement significative entre les isolats étudiés ( $F = 11,46$ ,  $p < 0,0001$ ), entre les variétés ( $F = 36,22$ ,  $p < 0,0001$ ) ; l'effet variété est donc plus fort que l'effet isolat.

### Effet isolat

Le test de Student-Newman et Keuls, au seuil de 5%, permet de classer les isolats en quatre groupes, selon la taille moyenne des lésions sur les 3 variétés (Spunta, Agora, et Sarpomira).

- Le groupe A contient les isolats qui induisent les lésions les plus importantes sur l'ensemble des variétés, dont la taille moyenne des lésions est comprise entre 10.16 et 10.46 cm<sup>2</sup> il s'agit de HMT8 et ARP1.
- Le groupe B est formé d'un isolat uniquement, HMT7 dont la taille moyenne de la lésion est de (8.374 cm<sup>2</sup>).
- Le groupe C englobe deux isolats CBT et CHA4 qui provoquent des lésions d'une taille moyenne qui varie de 6.62 à 7.03 cm<sup>2</sup>.
- Le groupe D contient les isolats, ITCMI et SD2 qui provoquent les lésions les plus faibles dont la taille moyenne est comprise entre 3,00 et 4.29cm<sup>2</sup>.

### **Effet variété**

L'analyse de variance des résultats d'agressivité pour la variable taille de lésions a révélé aussi une différence hautement significative entre les variétés testées. Le test de Student-Newman et keuls, au seuil 5% permet de classer les variétés en trois groupes :

- Le premier groupe contient la variété Agora sur laquelle les isolats provoquent en moyenne de grandes lésions (9.8386 cm<sup>2</sup>). Cette variété s'est montré donc très sensible surtout vis-à-vis d'isolats issus de tomate.
- Le deuxième groupe est constitué par la variété Spunta sur lesquelles les isolats provoquent de moyennes à grandes lésions (7.8225 cm<sup>2</sup>). C'est une variété qui a montré une sensibilité surtout vis-à-vis d'isolats collectés de la pomme de terre.
- Le troisième groupe comprend la variété Sarpo Mira ou les isolats provoquent des petites lésions (3.4315 cm<sup>2</sup>). La variété Sarpo Mira est donc moyennement résistante en comparaison avec les autres variétés.

### **III.1.5.2. La sporulation**

Les figures 35, 36 présentent les résultats de la sporulation pour chaque isolat sur chacune des variétés testées après 7 jours d'incubation à 20° C. Ces figures montrent que la sporulation est variable selon les isolats et les cultivars testés.

L'analyse de la variance pour la variable nombre de spores par lésions, montre un effet hautement significatif des variétés (F= 24,30 p< 0,0001), et des isolats (F = 4,82, p<0,0008).

L'effet variété est donc plus fort que l'effet isolat.

De même pour la capacité de sporulation, l'analyse de variance révèle un effet hautement significatif des variétés ( $F = 12.18, p < 0,0001$ ) et une différence significative entre les isolats ( $F = 2,30, p < 0,05$ ).

### Effet isolat

Pour la variable sporulation par lésions, la figure 35 montre que sur Agora les isolats produisent le plus grand nombre de spores par lésion (450000 spores en moyenne par lésion), tandis que le nombre de spores produit sur Spunta est assez grand (273000 spores par lésions) par rapport à la sporulation sur Agora. Par contre la sporulation par lésions est très faible sur Sarpomira (58000 spores par lésion) pour l'ensemble des isolats testés.

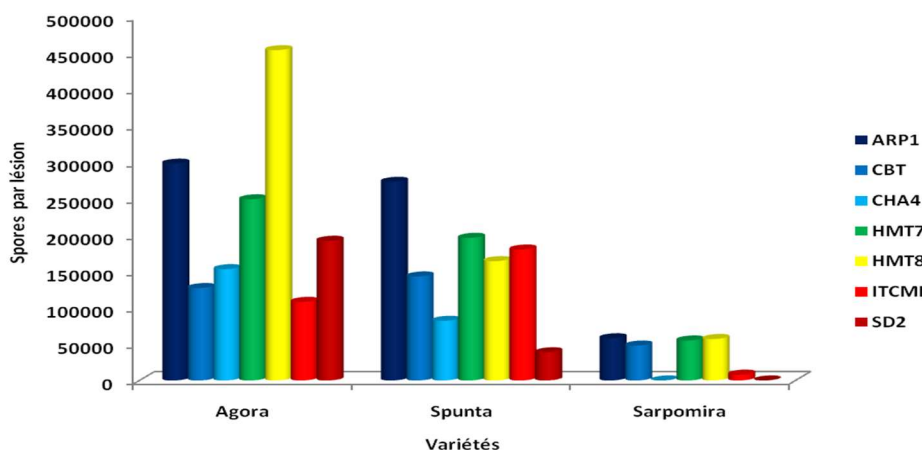


Fig. 35 : Sporulation par lésions provoquées par les isolats de *Phytophthora infestans* sur les variétés testées.

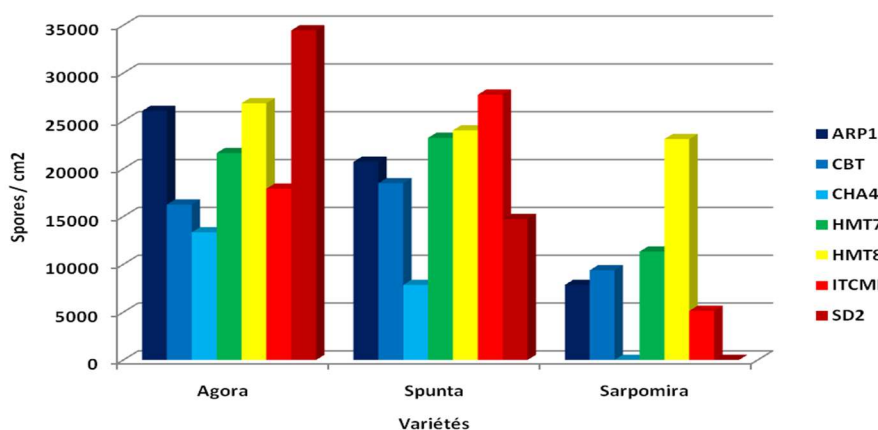


Fig. 36 : Capacité de sporulation des isolats de *Phytophthora infestans* testés sur les trois variétés.

Les deux isolats, HMT8 (groupe A) et ARP1 (groupe B) produisent le plus grand nombre de spores (227833 spores par lésions) par rapport aux autres isolats, sur l'ensemble des variétés (Tableau 10). Sur la variété de tomate Agora, l'isolat HMT8 (issu de tomate, variété Agora) produit plus de spores que ARP1 (isolat issu de la pomme de terre, variété Spunta). Par contre sur la variété Spunta, c'est l'isolat ARP1 qui s'est montré plus agressif. L'isolat, HMT7 du groupe C et les isolats, CBT et ITCMI du groupe D, produisent un nombre moyen de spores (123778 spores par lésion), tandis que les deux isolats, CHA4 et SD2 (groupe E) produisent le plus faible nombre de spores sur Spunta (60333.33spores par lésion). La sporulation de ces deux isolats est plus importante sur Agora (172500 spores par lésion) et elle est nulle sur la variété de pomme de terre, Sarpo Mira.

**Tableau 10 :** Classement des isolats en groupes, selon le nombre de spores par lésion sur 3 variétés (Agora, Spunta, Sarpo Mira).

Groupes	Nombre de sporanges par lésion	Isolats
A	246000	HMT8
B	209667	ARP1
C	166667	HMT7
D	106000-98667	ITCMI, CBT
E	78333-76889	SD2, CHA4

Pour la variable sporulation par cm<sup>2</sup> les isolats sont classés en trois groupes (Tableau 11).

**Tableau 11 :** Classement des isolats en groupe, selon la capacité de sporulation sur 3 variétés (Agora, Spunta, Sarpo Mira).

Groupes	Nombre de sporanges par cm <sup>2</sup>	Isolats
A	24846	HMT8
B	14701 - 18729	CBT, SD2, ITCMI, ARP1, HMT7
C	7061	CHA4

L'isolat HMT8 du groupe A produit le plus grand nombre de spores par cm<sup>2</sup> sur l'ensemble des variétés, alors que les isolats : ARP1, HMT7, CBT, ITCMI et SD2 du groupe B ont une capacité de sporulation moins importante sur Spunta et Agora. En revanche, l'isolat SD2 s'est montré différent avec une capacité de sporulation plus importante sur la variété Agora en comparaison avec les différents isolats testés. La capacité de sporulation pour l'ensemble des isolats est plus faible sur Sarpo Mira. Pour l'isolat CHA4 du groupe C, la capacité de sporulation est plus faible sur Spunta, moyenne sur Agora et nulle sur Sarpo Mira.

**Effet variété**

Pour la variable, sporulation par lésion, l'analyse de variance classe les variétés en trois groupes distincts (Tableau 12), avec Agora dans le premier groupe, Spunta dans le deuxième et Sarpo Mira dans le troisième.

**Tableau 12** : Classement des variétés pour la variable Sporulation par lésion.

Groupes	Sporanges moyenne par lésion	Variété
A	225857	Agora
B	153810	Spunta
C	31050	Sarpo Mira

Le nombre moyen de sporanges produit sur la variété Agora est de 225857 sporanges par lésion alors que sur la variété Spunta, il est de 153810 sporanges par lésion. Sur la variété Sarpo Mira, la sporulation moyenne est de 31050 sporanges par lésion.

Concernant la variable capacité de sporulation, les variétés sont classées dans deux groupes (Tableau 13). En premier lieu, la variété Agora, avec 22356 sporanges/cm<sup>2</sup> en moyenne et en deuxième groupe, la variété Spunta avec 19535 sporanges/cm<sup>2</sup> et la variété Sarpo Mira avec 7364 sporanges/cm<sup>2</sup>.

**Tableau 13** : Classement des variétés pour la variable capacité de sporulation.

Groupes	Sporanges moyenne par cm <sup>2</sup>	Variété
A	22356	Agora
B	7364 -19535	Sarpo Mira, Spunta

**III-1.6 Caractérisation génotypique**

57 allèles ont été détectés à travers les 12 *loci*, allant de 2 (*loci*, Pi70 et SSR2) à 12 (*locus* G11) par *locus* (Tableau 14). Les allèles, 173 de *locus* SSR2 et 244 de *locus* SSR6 ont été détectés chez tous les isolats testés. Quelques allèles ont été détectés seulement une fois (fréquence de 0.015) parmi tous les isolats testés. La valeur du gène de diversité (H) a été comprise entre 0.162 (*locus* SSR2) et 0.823 (*locus* SSR4) (Tableau 14).

Tableau 14 : Fréquence des allèles et indice de la diversité génétique des *loci* SSR.

<b>Locus SSR</b>	<b>Fragments</b>	<b>Allèles détectés et fréquences des allèles (entre parenthèses)</b>	<b>Indice de diversité génétique (H)</b>
Pi02	5	258 (0.103) 266 (0.310) 268 (0.517) 0.517 270 (0.051) 272 (0.017)	0,561
Pi4B	3	205 (0.285) 213 (0.393) 217 (0.321)	0,660
		142 (0.092) 152 (0.015) 154 (0.277) 156 (0.107) 158 (0.015)	
G11	12	160 (0.246) 162 (0.046) 164 (0.031) 168 (0.015) 206 (0.123)	0,823
		208 (0.015) 210 (0.015)	
Pi04	3	166 (0.423) 168 (0.077) 170 (0.500)	0,565
Pi63	3	270 (0.163) 273 (0.327) 279 (0.509)	0,607
Pi70	2	192 (0.839) 195 (0.161)	0,269
		136 (0.523) 138 (0.031) 140 (0.169) 144 (0.015) 152 (0.015)	
D13	9	154 (0.200) 158 (0.015) 206 (0.015) 210 (0.015)	0,655
SSR11	3	331 (0.074) 341 (0.796) 355 (0.129)	0,343
SSR2	2	173 (0.0911) 175 (0.089)	0,162
		284 (0.278) 288 (0.115) 290 (0.131) 292 (0.098) 294 (0.262)	
SSR4	9	296 (0.049) 298 (0.016) 300 (0.033) 302 (0.016)	0,809
SSR6	3	240 (0.259) 242 (0.167) 244 (0.574)	0,574
SSR8	3	260 (0.426) 264 (0.111) 266 (0.463)	0,592
<b>Total</b>	<b>57</b>		

La comparaison des empreintes génétiques des 117 isolats de *Phytophthora infestans* analysés par SSR avec le profil des autres lignées de référence (Cooke *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012) a permis de déterminer 4 types dont le plus fréquent est le génotype :13\_A2 (n = 78) suivi par d'autres types, 2\_A1 et 23\_A1 (génotypes détectés 25 et 6 fois, respectivement) (Figure 37). 8 isolats nommés "Misc" (abréviation de *miscellaneous*), de type A1 (n=6) et A2 (n=2), différents des lignées connues (Figure 37) ont été détectés. Le génotype 2\_A1 a été le plus dominant (10 isolats) dans la population collectée durant la période 2008-2012 suivi par les génotypes, Misc et 13\_A2 (5 et 4 isolats, respectivement) (Figure 37). Inversement, le génotype 13\_A2 a été dominant dans les populations de *P. infestans* collectée en 2013 et 2014 (48 et 26 isolats, respectivement). Le génotype 23\_A1 a été détecté une fois (isolat BT9) dans les isolats collectés de tomate en 2013 et 5 fois dans les isolats collectés de pomme de terre en 2014 à Mostaganem. La diversité génétique a été plus élevée dans la population collectée de cette région par rapport à celle collectée de Ain Defla et d'autres régions dans le nord-ouest d'Algérie (Figures 38, 39, 40).

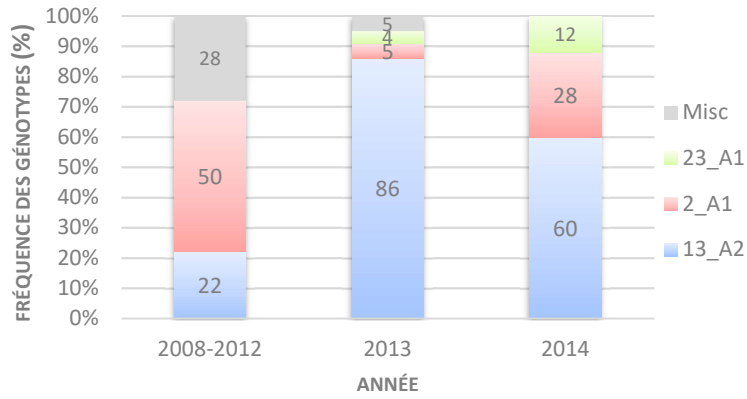


Fig. 37 : Fréquence de génotypes des isolats de *Phytophthora infestans* collectés dans la région du Nord-Ouest d'Algérie durant 2008-2014.

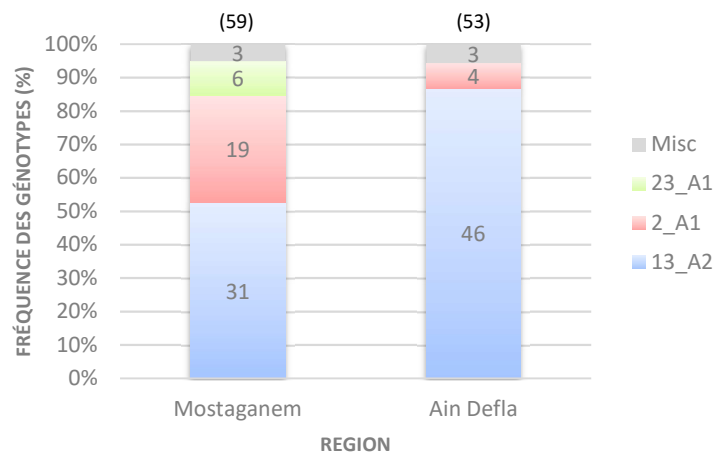


Fig. 38 : Fréquence de génotypes des isolats de *Phytophthora infestans* collectés dans deux régions, Mostaganem et Ain Defla durant 2008-2014.



Fig. 39 : Répartition des génotypes des isolats de *Phytophthora infestans* collectés dans le nord-ouest d'Algérie durant 2008-2014.

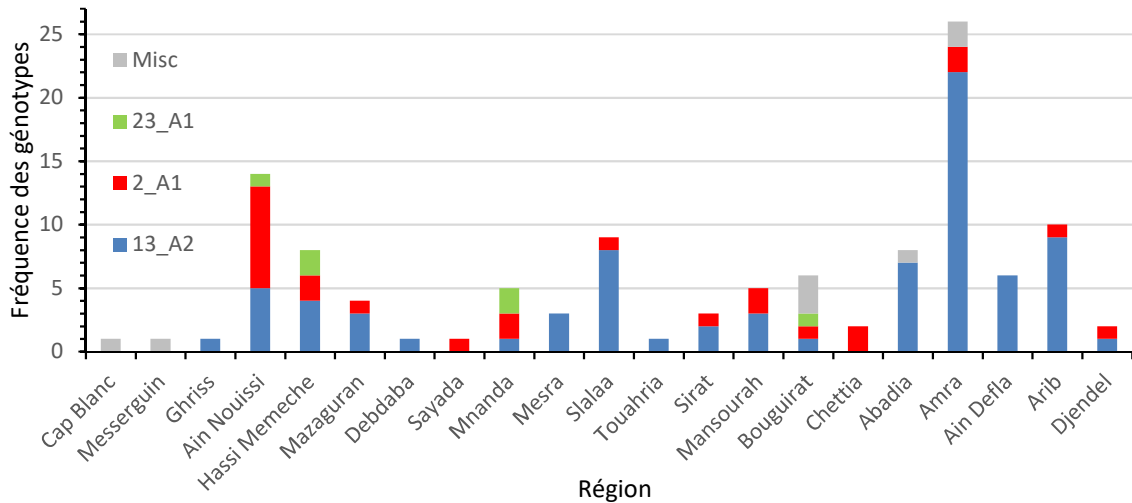


Fig. 40 : Fréquences des génotypes de *Phytophthora infestans* dans chaque site de prélèvement durant la période 2008-2014.

Quelques variations ont été détectées sur le profil génétique des isolats de type 13\_A2 au niveau des *loci*, G11, D13 et SSR4. Ces isolats ont été définis comme des lignées sous-clonales dont la plus fréquente est 13\_A2\_2 (50 isolats) suivi par 13\_A2\_22 (8 isolats) et 13\_A2\_1 (6 isolats). En plus, d'autres génotypes sous-clonales (13\_A2\_50, 13\_A2\_61, 13\_A2\_68, 13\_A2\_86 et 13\_A2\_101) ont été identifiés mais avec des faibles fréquences (Figure 41A). Tous ces génotypes sous-clonales ont été détectés à Mostaganem avec la dominance de 13\_A2\_2. Ce dernier a été aussi dominant à Ain Defla mais les génotypes sous-clonales, 13\_A2\_68, 13\_A2\_86 et 13\_A2\_101 ont été absents dans cette région (Figure 41B).

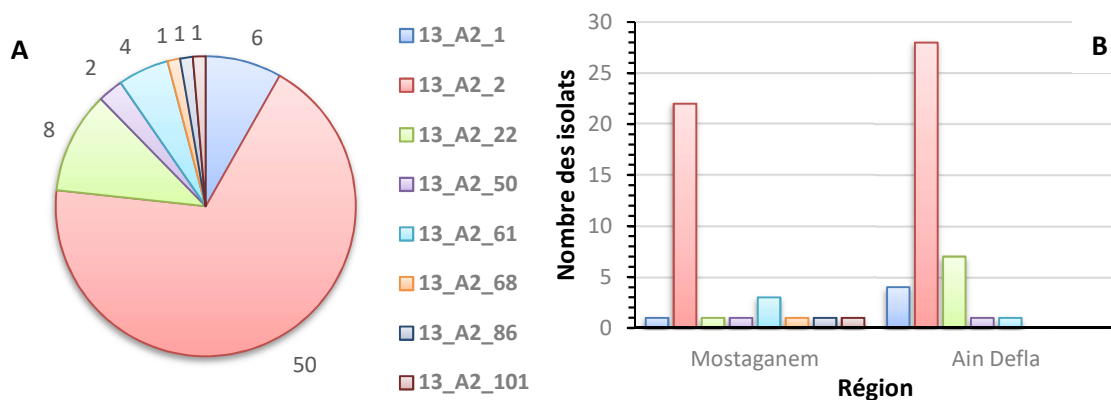


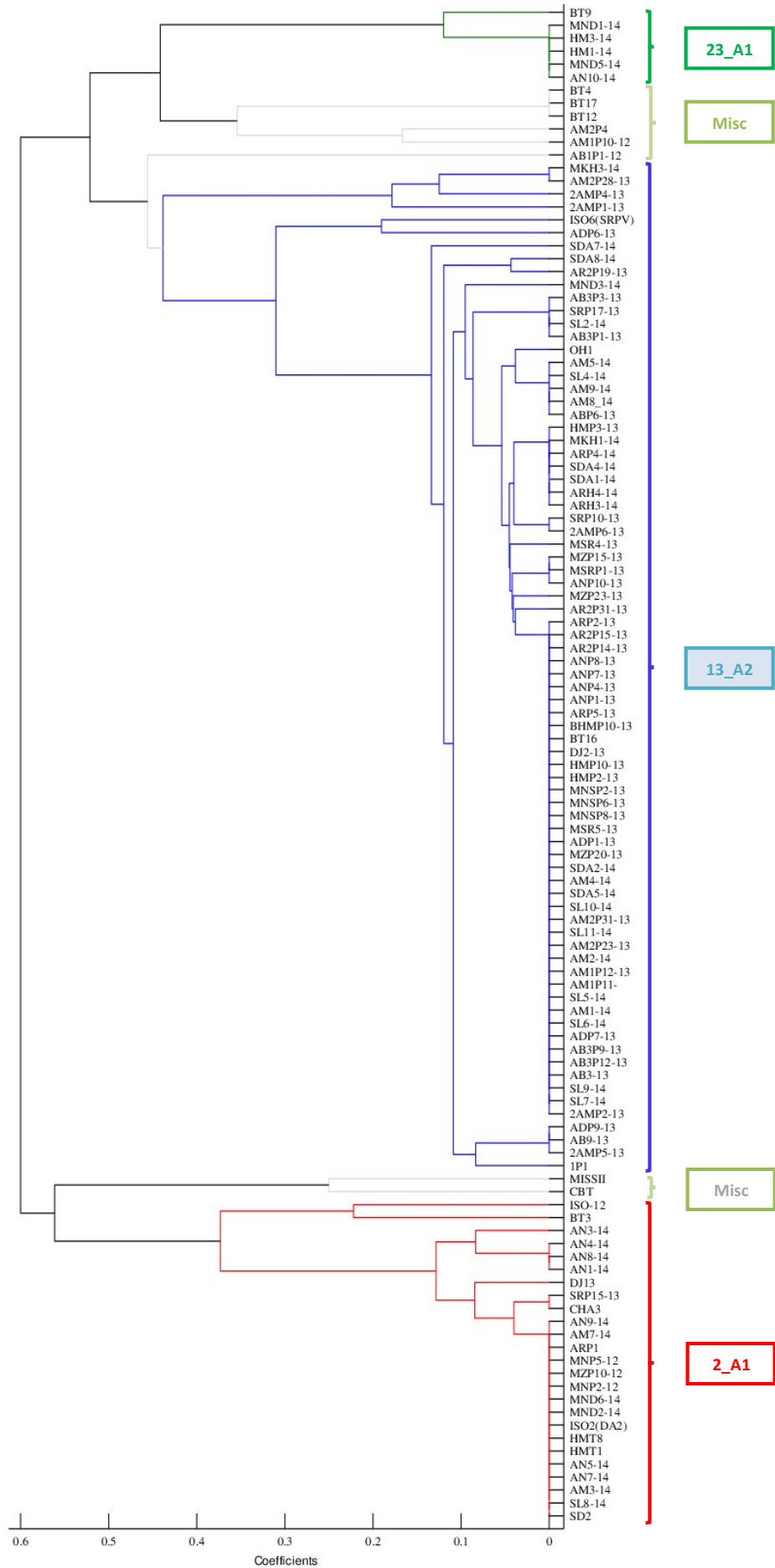
Fig. 41 : A : Fréquence des sous-groupes du génotype 13\_A2 dans l'ensemble de la population étudiée dans le nord-ouest algérien ; B : Fréquence des sous-groupes du génotype 13\_A2 dans les régions, Mostaganem et Ain Defla.

Le dendrogramme obtenu par l'analyse de groupes (UPGMA) des profils SSR nous a permis de classer les isolats testés en 3 groupes importants représentant les lignées, 23\_A1, 13\_A2 et 2\_A1 ainsi que deux groupes d'isolats non identifiés nommé "Misc" (Figure 42). Le premier groupe est constitué de 6 isolats du génotype 23\_A1; 5 isolats avec un profil génétique identique détectés sur la variété de pomme de terre Spunta dans la wilaya de Mostaganem en 2014 et un isolat collecté de tomate, variété Agora en 2013 différent des autres MLG au niveau de des *loci*, Pi02 et SSR4. Ces petites différences alléliques ont résulté pour un coefficient Jaccard de 0.12 (Figure 42). Le second groupe est formé de 4 isolats de type Misc\_A1 collectés de tomate et de pomme de terre, et 2 isolats Misc\_A2 collectés de pomme de terre. Trois isolats A1 collectés de la même serre ont été identiques sur le plan génétique mais les autres ont été distincts et ils sont groupés aux coefficients de 0.35 de 0.45.

Le troisième groupe rassemble 78 isolats de type 13\_A2 dont un isolat collecté de tomate (BT16) et le reste obtenu de pomme de terre. La majorité des isolats 13\_A2 sont groupés aux valeurs 0,12 ou moins. Le sous-groupes dans 13\_A2 sont apparus comme des groupes d'isolats génétiquement identiques mais séparés par des différences de 1 ou moins. Le quatrième groupe est formé de 2 isolats Misc\_A1 provenant de la région d'Oran dont un a été collecté de pomme de terre (MISS II) et le second (CBT) a été prélevé de tomate. Le cinquième groupe est constitué de 25 isolats du génotype 2\_A1 dont trois seulement ont été collectés de tomate. La majorité sont groupés aux coefficients Jaccard de 0.12.

Fig. 42 : Dendrogramme des isolats de *P. infestans* obtenu par l'analyse des données SSR avec la méthode UPGMA en utilisant les coefficients Jaccard

sous Matlab.



## **III-2 Discussions**

Dans cette étude 161 isolats algériens de *Phytophthora infestans* collectés durant la période 2008-2014 ont été caractérisés sur le plan phénotypique et génotypique par l'utilisation des marqueurs microsatellites. Les résultats obtenus ont révélé des aspects importants des populations de *P. infestans* dans la région nord-ouest d'Algérie durant cette période. L'analyse du type sexuel a indiqué la dominance du type A2 et le test de résistance des isolats au métalaxyl a révélé l'émergence d'isolats résistants durant la période 2008-2014. L'analyse génotypique par les marqueurs SSR a révélé la dominance de la lignée clonale 13-A2 et la présence de deux autres lignées moins fréquentes et des génotypes non identifiés.

### **III-2.1 Type sexuel**

Malgré la fréquence du mildiou en Algérie sur pomme de terre et tomate, qui sont deux principales cultures maraichères, il existe peu de données sur l'agent pathogène. Les premiers travaux réalisés sur un nombre limité d'isolats (Beninal *et al.*, 2009 ; Rekad, 2009 ; Corbière *et al.*, 2010) ont confirmé la présence des deux types sexuels, A1 et A2 dans la population algérienne de *P. infestans* durant la période 2007-2008. Des analyses plus détaillées sur les isolats collectés en 2013 et 2014 dans cette étude ont confirmé la dominance du type sexuel A2 dans deux régions importantes de production de pomme de terre. La dominance d'isolats de type A2 sur pomme de terre dans la plupart des sites de prélèvement peut être liée à l'émergence de nouvelles souches plus agressives introduites via l'importation massive de semence provenant principalement des pays européens tels que les Pays-Bas (58%), la France (16%) et le Danemark (13%) (Bourget, 2008 ; Rousselle, 2008) où le type sexuel A2 est prédominant. Le changement qui a caractérisé les populations de *P. infestans* dans plusieurs pays d'Europe durant la dernière décennie, suite à l'invasion par des souches A2 (Li *et al.*, 2012; Cooke *et al.*, 2012; Montarry *et al.*, 2008; Mariette *et al.*, 2016), laisse suggérer l'hypothèse que notre région a connu la même situation que ces pays. Des résultats similaires ont été obtenus sur les populations de *P. infestans* au Maroc (Hammi *et al.*, 2002; Sedegui *et al.*, 2000). Inversement, une faible fréquence du type sexuel A2 a été signalée dans plusieurs pays tels que la Tunisie (Hamada et Harbaoui, 2010; Harbaoui *et al.*, 2013), l'Italie (Savazzini et Galletti, 2015) et la Chine (Tian *et al.*, 2015).

Sur tomate, les 15 isolats collectés ont été tous de types sexuel A1 sauf pour un seul isolat (BT16), de type A2. Bien que le nombre d'isolats prélevés sur tomate soit faible, il semblerait exister une homogénéité dans la population de *P. infestans* au niveau de cette culture. Cette

distinction entre les isolats des deux hôtes nécessite d'être confirmée avec un large nombre d'isolats tomate. Plusieurs travaux ont montré que des lignées clonales distinctes de *P. infestans* sont associées avec les deux hôtes, pomme de terre et tomate dans la même région (Legard et al., 1995; Oyarzun et al., 1998; Suassuna et al., 2004) contrairement aux résultats de Chowdappa et al., (2015) obtenus sur les populations de *P. infestans*, qui a trouvé que les souches A2 du génotype 13\_A2 ont été responsables de sévères épidémies sur pomme de terre et sur tomate dans l'Inde du Sud.

Les résultats obtenus sur le type sexuel ont révélé que les fréquences des deux types sexuels, A1 et A2 varient beaucoup entre Ain Defla et Mostaganem, deux régions potentielles pour la production de pomme de terre. Le taux élevé de souche de type A2 dans la région de Ain Defla peut être expliqué par une adaptation de ces souches aux cultures présentes au niveau des sites des prélèvements dans cette région où la culture de tomate sous serre est pratiquée dans des sites loin de la culture de pomme de terre. Il est important de signaler que tous les sites de culture de tomate prospectés dans la wilaya de Ain Defla ont été indemnes de mildiou en 2013 et 2014. Inversement, la pomme de terre et la tomate sont cultivées dans des parcelles adjacentes dans la wilaya de Mostaganem. La proximité des fréquences des deux types sexuels dans cette région peut être expliquée par la propagation et l'échange des isolats entre les deux cultures. La coexistence de ces souches compatibles sexuellement pourrait engendrer la reproduction sexuée qui se traduirait par la formation d'oospores dans le tissu du végétal et permettrait la survie du pathogène dans le sol en l'absence de l'hôte. Il est donc possible que la reproduction sexuée existe en Algérie. Ces organes sexués (oospores) sont capables de survivre plusieurs hivers dans le sol et de germer au retour de la culture dans la parcelle (Drenth et al., 1995 ; Medina & Platt, 1999 ; Hammi et al., 2001). Selon plusieurs auteurs, (Anderson et al., 1998 ; Lehtinen & Hannukkala, 2004 ; Rubin & Cohen, 2006 ; Fry, 2008), ces structures sont susceptibles d'entraîner une plus grande précocité des épidémies, ce qui pourrait en partie expliquer les dégâts importants notés sur certaines cultures, lors de nos prospections. Il est possible que cette reproduction sexuée ait existé depuis si longtemps et pourrait aussi être à l'origine de l'apparition de nouveaux génotypes plus agressifs que des isolats anciens. D'après Drenth et al. (1994), les oospores constituent une source importante de variabilité génétique. On peut alors supposer que certains isolats A2, issus de cette reproduction sexuée, auraient envahi les cultures de pomme de terre. Cependant, comme aucune étude n'a jamais été réalisée en Algérie, nous ne disposons pas de donnée sur les populations algériennes avant 2007. Un deuxième facteur, la migration, est aussi à considérer

pour expliquer la structure des populations de *P. infestans* (Fry *et al.*, 1992 ; Daggett *et al.*, 1992 ; Sujkowski *et al.*, 1993 ; Goodwin *et al.*, 1994).

### **III-2.2 Effet de facteurs physicochimiques sur le développement de *P. infestans***

Nos résultats concernant l'effet de quelques facteurs : milieux de cultures, lumière, et la température sur la croissance mycélienne et la sporulation des isolats testés ont permis de constater que :

Les deux milieux de cultures, petit pois et pois chiche ont permis une bonne croissance mycélienne. Mais cette dernière est plus importante sur le milieu petit pois que sur le milieu pois chiche. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Hammi, (2003). Par contre, nos résultats pour la sporulation, montrent qu'elle est plus importante sur le milieu pois chiche que sur le milieu petit pois.

Nos résultats sur la croissance mycélienne et la sporulation sur les deux milieux de cultures montrent les exigences trophiques particulièrement spécifiques à ce parasite en comparaison avec d'autres parasites.

Pour le test de l'effet de la lumière et l'obscurité, nos résultats montrent que la croissance mycélienne et la sporulation sont plus importantes à l'obscurité. Ce résultat confirme l'effet inhibiteur de la lumière sur le développement de *P. infestans*. Ceci explique le développement et la fructification importante de *P. infestans* rencontrés à la face inférieure des feuilles de l'hôte dans le champ, surtout dans les conditions de ciel couvert.

Nos résultats concernant la croissance mycélienne à différentes températures sont compatibles avec les travaux de Crosier, (1934) ; Harrison, (1992) ; Rekad, (2009). Ces résultats confirment que l'optimum thermique pour une bonne croissance mycélienne chez *P. infestans in vitro*, est de 20 °C.

### **III-2.3 Test d'agressivité des isolats sur les différentes variétés**

L'évaluation de l'agressivité des différents isolats testés a révélé l'existence d'une grande variabilité entre ces derniers vis-à-vis des deux variétés de pomme de terre (Spunta, Sarpo Mira) et celle de tomate (Agora).

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que les isolats issus de la pomme de terre présentent des degrés d'agressivité élevés sur les deux hôtes (pomme de terre et tomate), alors que les isolats issus de la tomate sont plus adaptés à leur hôte d'origine (tomate). Ces

résultats ont été confirmés aussi par, Legard et *al.* (1995) ; Oyarzun et *al.* (1997) ; Lebreton et *al.* (1999).

Sur la variété de pomme de terre Spunta, la majorité des isolats issus de la pomme de terre ou de la tomate ont montré un degré d'agressivité comparable sur les folioles de cette variété (taille des lésions et sporulation). Sur la variété Agora, les isolats issus de la tomate sont significativement plus agressifs que les isolats de la pomme de terre, résultat obtenu aussi par Hammi, (2003), tandis que nous avons remarqué que les isolats issus de la tomate sont plus agressifs que les isolats issus de la pomme de terre sur la variété de pomme de terre Sarpo Mira.

Par ailleurs, cette étude d'agressivité des isolats menée sur les feuilles détachées a montré que les variétés de pomme de terre ou de tomate présentent des niveaux élevés de sensibilité au pathogène. Néanmoins, les deux cultivars de pomme de terre peuvent être subdivisés en 2 groupes, la variété Spunta étant plus sensible par rapport à la variété Sarpo Mira. Ce résultat concorde avec celui obtenu par Hammi, (2003) ; Rekad et *al.* (2009) ; Corbière et *al.* (2010). Ceci peut être expliqué par sa large utilisation. Inversement aux résultats de l'étude menée par Galfout et *al.*, 2010, qui a révélé que la variété Sarpo Mira est totalement résistante aux différents isolats de *Phytophthora infestans* testés, nos résultats obtenus sur cette variété ont montré que cette dernière est sensible vis-à-vis de quelques isolats testés, mais avec un degré moins important par rapport aux autres variétés. Cette sensibilité remarquée chez les variétés testées peut être liée à la présence dans la zone d'étude d'une population du pathogène très agressive qui a remplacé peut-être une ancienne population avec une agressivité relativement faible.

### **III-2.4 Résistance des isolats au métalaxyl**

L'évaluation de la résistance des isolats au métalaxyl *in vivo* a révélé la dominance d'isolats résistants durant toute la période d'étude (73% durant 2008-2012, 96 % en 2013 et 95 % en 2014) et dans la plupart des sites d'échantillonnage.

Plusieurs études ont rapporté l'existence du phénomène d'acquisition de la résistance au métalaxyl par les populations de *P. infestans* dans plusieurs pays dans le monde (Deahl et *al.*, 2002 ; Yuan et *al.*, 2006 ; Śliwka et *al.*, 2006 ; Gisi & Cohen, 1996 ; Goodwin et *al.*, 1998; Jmour & Hamada 2006; Pliakhnevich et Ivaniuk 2008; Duvauchelle et *al.*, 2009; Harbaoui et *al.*, 2013; Savazzini & Galletti, 2015). Inversement, des faibles niveaux de résistance ont été

rapportés en Norvège, Suède, Finlande, Danemark (Lehtinen et al., 2008), Pologne (Chmielarz et al., 2014) et Lettonie (Aav et al., 2015).

Dans cette étude, la résistance au métalaxyl a été observée dans les deux régions, Ain Defla et Mostaganem avec un taux élevé chez les isolats de type A2. Cette relation entre la résistance au métalaxyl et le type sexuel A2 a été détectée aussi chez des isolats algériens de *P. infestans* collectés durant la période 2007-2008 (Rekad, 2009). Nos résultats concordent avec le résultat obtenu par Beninal et al. (2009) et ceux obtenus dans plusieurs régions dans le monde (Miller et al., 1997; Goodwin et al., 1998; Cooke et al., 2003; Hammi et al., 2002; Fontem et al., 2005). Le taux élevé de résistance au métalaxyl peut être associé aussi à l'émergence d'une nouvelle population d'isolats de type A2 plus tolérante à ce fongicide comme il a été signalé dans plusieurs régions en Europe (Cooke et al., 2012). Aussi, l'utilisation massive de traitements à base de métalaxyl en Algérie, particulièrement depuis l'épidémie sévère enregistrée durant la période 2007-2008 (Corbière et al., 2010) a probablement favorisé l'évolution rapide de population résistante. Ces résultats suggèrent que l'utilisation de métalaxyl dans le control de mildiou n'est peut-être pas une stratégie de lutte convenable en Algérie. C'est la raison pour laquelle il est fortement recommandé de limiter ou même supprimer l'usage des fongicides à base de métalaxyl sur pomme de terre. En Europe, cette matière active n'est plus utilisée depuis plusieurs années et a été remplacée par un dérivé, le méfénoxam dont l'utilisation est restreinte. Il est fortement recommandé de ne traiter qu'en début de culture, pendant la croissance active de la plante et de ne pas réaliser plus de deux traitements dans la saison (Dubois et al., 2007). Cependant, même avec ces préconisations, beaucoup de souches sont devenues résistantes au méfénoxam (Dubois et al., 2007).

### **III-2.5 Caractérisation génotypique des isolats**

L'étude de la structure génétique des isolats par les marqueurs microsatellites a révélé une faible diversité génétique au sein de la population de *Phytophthora infestans* dans la région nord-ouest d'Algérie. La lignée clonale 13\_A2 a été la plus dominante, particulièrement sur les cultures de pomme de terre et s'est présentée avec plusieurs génotypes sous clonaux dans différents sites de prélèvement. Il est probable que la lignée 13\_A2 se soit introduite et propagée en Algérie suite à l'importation de semence de pomme de terre infestée. Cette lignée nommée aussi "Blue 13", connue par sa résistance au métalaxyl a été premièrement détectée en Allemagne et au Pays-Bas en 2004 (Cooke et al., 2012). Durant la dernière décennie, la dominance de ce génotype a été rapportée dans plusieurs pays d'Europe (Cooke et al., 2010;

Kildea *et al.*, 2010; Mariette *et al.*, 2015) avec une propagation vers l'Asie (Chowdappa *et al.*, 2015). D'après certains auteurs (Lees *et al.*, 2009; White & Shaw 2009; Cooke *et al.*, 2012, Chmielarz *et al.*, 2014), la dominance de 13\_A2 est attribuée à l'évolution rapide de sa virulence et agressivité. Il a été rapporté que ce génotype s'est montré le plus agressif sur 5 variétés de pomme de terre (Cooke *et al.*, 2012) et s'est bien adapté aux conditions chaudes comme c'est le cas au sud de l'Inde où la température varie de 20.8 °C à 22.5 °C, conditions sous lesquelles la lignée 13\_A2 a causé des épidémies sur pomme de terre et tomate (Chowdappa *et al.*, 2013; Chowdappa *et al.*, 2015). Ceci explique l'adaptation de ce génotype aux conditions de culture en Algérie où la température moyenne varie de 12 à 22 °C durant la plus importante saison de culture. La dominance des isolats de type 13\_A2 dans la région nord-ouest d'Algérie peut être associée avec leur adaptation à la variété Spunta qui est largement cultivée pour son cycle court et sa productivité. L'étude du pouvoir pathogène de quelques isolats de *P. infestans* collectés de cette région en 2008 sur différents cultivars de pomme de terre a révélé une agressivité significative de ces isolats sur la variété Spunta (Corbière *et al.*, 2010). A l'instar d'autres études (Cooke *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012), des variants sous-clonaux ont été observés chez la population 13\_A2 en Algérie. Le sous-type 13\_A2\_2 a été le plus commun durant la période 2008 to 2014 avec d'autres sous types moins fréquents.

Dans cette étude, les isolats de type 2\_A1 ont été détectés sur les deux hôtes, pomme de terre et tomate. Cet ancien génotype a été identifié en Europe depuis 1982 (Cooke *et al.*, 2012) et s'est probablement introduit en Algérie via l'importation de semence de pomme de terre dans le passé. Le déclin des isolats 2\_A1 durant la période d'étude peut être expliqué par leur remplacement par des isolats de type 13\_A2 plus agressifs et résistants au métalaxyl.

Le troisième génotype détecté parmi la population algérienne de *P. infestans* a été 23\_A1. Cette lignée a été présente aussi sur les deux hôtes mais seulement dans la région de Mostaganem où elle a été détectée pour la première fois en 2013 sur tomate ensuite en 2014 sur pomme de terre. Ce résultat confirme que le génotype 23\_A1 n'est pas spécifique à la culture de tomate comme il a été signalé par Corbières *et al.* en 2015. En Grande Bretagne, la lignée 23\_A1 a été la plus dominante sur tomate mais moins fréquente sur pomme de terre durant l'année 2012 (Stroud *et al.*, 2015). Inversement, elle a été présente avec une fréquence très élevée sur pomme de terre au sein de la population de *P. infestans* en Egypte (El-Ganainy *et al.*, 2015).

Les trois lignées clonales identifiées dans cette étude n'ont pas été détectées dans la population tunisienne de *P. infestans* qui comporte des génotypes qui n'ont jamais été signalés en Europe (Harbaoui *et al.*, 2014).

Dans cette étude, 8 isolats nommés "Misc", différents de l'ensemble des génotypes déterminés ont été détectés sur les deux hôtes dans différents sites. Parmi ces isolats, 6 ont été de type sexuel A1 et deux de type A2. Ces MLG "Misc" sont interprétés comme étant le résultat de la germination d'oospores générés par voie sexuée dans quelques régions d'Europe (Sjöholm *et al.*, 2013). Comme les isolats "Misc" ont été collectés à partir des parcelles où les deux types sexuels ont été présents, il est possible que ces génotypes ont été générés suite à une recombinaison sexuelle des deux types sexuels. En outre, lors de nos prospections dans certaines parcelles de pomme de terre irriguées par rigoles au niveau de la wilaya de Mostaganem, les premiers symptômes de mildiou ont été observés sur la base des tiges de plants. Ces derniers ont été probablement infestés par des oospores issues de la reproduction sexuée.

Finalement, une diversité génétique plus élevée a été observée dans la population de *P. infestans* collectée de la région de Mostaganem en comparaison avec la population de Ain Defla. Plus de trois MLGs ont été détectées dans la même parcelle au niveau de certains sites de prélèvement à Mostaganem. Ce résultat peut être associé à la propagation de la reproduction sexuée dans cette région où les deux types sexuels ont été présents dans la plupart des sites de prélèvement. D'après Goodwin *et al.* (1995), la recombinaison sexuelle contribue couramment à l'évolution de la structure génétique du pathogène. En effet, la diversité génétique élevée observée dans les populations de *P. infestans* de l'Europe du nord et de l'Estonie a été attribuée à l'implication de la reproduction sexuée (Sjöholm *et al.*, 2013; Runno-Paurson *et al.*, 2016). La diversité génétique observée dans la région de Mostaganem peut être liée aussi aux conditions climatiques spécifiques de cette région, qui permettent la culture de pomme de terre durant toute l'année. Ceci favorise l'apparition de plusieurs générations du pathogène et peut ainsi conduire à l'émergence de nouveaux génotypes.

Inversement, les populations de *P. infestans* sur pomme de terre dans la wilaya de Ain Defla est composée principalement de la lignée clonale "Blue 13". Il paraît que cette lignée s'est bien adaptée aux conditions climatiques chaudes qui caractérisent cette région particulièrement durant la saison de culture. L'étude réalisée par Shakya *et al.* (2015) sur l'effet de quelques facteurs climatiques tels que la température sur le développement de *P. infestans* ont montré une réponse variable entre les différentes lignées testées.

## Conclusions et perspectives

L'objectif général de cette thèse était de caractériser et comprendre la structure des populations de *Phytophthora infestans* présentes dans la région du nord-ouest d'Algérie, ce qui apportera des informations essentielles pour une meilleure gestion de la maladie du mildiou sur les cultures de pomme de terre et de tomate dans cette région.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que la population de *P. infestans* dans le nord-ouest d'Algérie est composée principalement d'isolats de type A2 associés à la lignée 13\_A2 et d'autres isolats de type A1 des deux génotypes, 2\_A1 et 23\_A1. Le suivi de la distribution et de l'évolution des différents génotypes présents dans la population du pathogène permettra de comprendre l'évolution et l'épidémiologie du mildiou en Algérie.

Cette étude a confirmé aussi l'émergence des souches de *P. infestans* résistantes au métalaxyl. Nos résultats montrent l'existence d'une bonne corrélation entre la résistance au métalaxyl et le type sexuel A2 représenté par les souches de génotype 13\_A2. Cette observation a déjà été faite avec des isolats européens dont les travaux ont montré la propagation d'une nouvelle population de la lignée "Bleu 13", caractérisée par sa tolérance au métalaxyl et une agressivité très élevée (Lees *et al.*, 2009 ; Cooke *et al.*, 2012)

Nous avons, par ailleurs, mis en évidence que certains isolats algériens sont agressifs sur la variété Sarpo Mira qui est décrite comme résistante et sur deux principales variétés cultivées en Algérie en particulier, la variété Spunta qui s'est montrée très sensible vis-à-vis de l'ensemble des isolats testés.

Il faut maintenant raisonner l'utilisation des variétés cultivées en Algérie, en prenant en compte leur niveau de résistance. La vulgarisation de nouvelles variétés ayant des niveaux de résistance plus durables est indispensable pour lutter efficacement contre le mildiou. Les stratégies de traitements fongicides doivent également être revues, puisque l'une des matières actives (métalaxyl) largement utilisée en Algérie ne semble plus être efficace sur pomme de terre.

En résumé, plusieurs perspectives sont suggérées pour maîtriser l'expansion du mildiou en Algérie. Il s'agit de :

## Conclusions et perspectives

---

- Déterminer la distribution annuelle des deux types sexuels, A1 et A2 dans toutes les zones de production de pomme de terre et de tomate en Algérie ;
- Vérifier la formation des oospores au champ sous les conditions climatiques algériennes et déterminer leur contribution dans l'épidémiologie de la maladie ;
- Continuer à tester le comportement des populations de l'agent pathogène au métalaxyl en portant l'accent sur les isolats de tomate ;
- Tester de nouvelles variétés de pomme de terre ayant de bons niveaux de résistance non spécifique vis-vis des souches de l'agent pathogène, au laboratoire et en plein champ. Ce screening doit être assuré par un suivi épidémiologique annuel et sur plusieurs sites, pour évaluer l'évolution de leur niveau de résistance.
- Proposer des stratégies de lutte contre le mildiou en associant de bonnes pratiques culturales (gestion des repousses, application des rotations), l'utilisation des variétés résistantes, la gestion raisonnée des fongicides.

Les résultats originaux obtenus dans la présente thèse qui aborde le mildiou de la pomme de terre en Algérie apportent des informations importantes sur la population du pathogène dans une région stratégique en Algérie pour engager une lutte intégrée contre cette maladie qui constitue un problème sérieux en particulier pour la culture de pomme de terre.

## Références Bibliographiques

- Aav A, Skrabule I, Bimšteine G, Kaart T, Williams IH, Runno-Paurson I**, 2015. The structure of mating type, metalaxyl resistance and virulence of *Phytophthora infestans* isolates collected from Latvia. *Zemdirbyste-Agriculture* **102**: 335–342.
- Agrios G. N.**, 1997. Plant Pathology, 4th edn. Academic Press, San Diego.
- Alexopoulos C.J.**, 1962. Introductory to Mycology. Jon Wiley and Sons, Inc. New York, USA, 158-162
- Alexopoulos C.J., Mims C.W. et Blacwell M.**, 1996. Introductory to Mycology. Jon Wiley and Sons, Inc. New York, USA, pp 154.
- Andersson B.**, 2007. Sexual reproduction in *Phytophthora infestans* – epidemiological consequences. Doctoral thesis N° 2007: 77, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Andersson B, Sandstrom M, Stromberg A**, 1998. Indications of soil borne inoculum of *Phytophthora infestans*. *Potato Research* **41**: 305–310.
- Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME**, 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* **36**: 181–186.
- Andriveau D.**, 1995. Biology, ecology and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. *Phytopathology* **85**: 1053-1056.
- Andriveau D.**, 1996. The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: a critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathology* **45**: 1028-1036.
- Andriveau D., Lebreton L.**, 1997. Mildiou de la pomme de terre, ou en somme-nous après 150 ans ?. *Phytoma*, 494 (Mai 1997) p : 24-27.
- Andriveau D., Lucas M. J.**, 1998. Des associations de variétés pour lutter contre le mildiou de la pomme de terre : est-ce possible ? Premier colloque transnational sur les luttes, biologique, intégrée et raisonnée. 21, 22, 23 janvier 1998 p : 55-56
- Andriveau D., Pilet F., Montarry J., Hafidi M., Corbière R., Achbani E.H., Pellé R., Ellisèche D.**, 2007. Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: Evidence from French and Moroccan populations. *Ecology and Epidemiology* **97**: 338–343.
- Avila-Adame C., Gomez-Alpizar L., Zismann V., Jones K. M., Buell C. R. and Ristaino J. B.**, 2006. Mitochondrial genome sequences and molecular evolution of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*. *Curr. Genet.* **49**: 39-46.
- Beninal L., Corbière R., Kedad A., Andriveau D., Bouznad Z.**, 2009. A2 mating type, metalaxyl resistance and complex virulence profiles: common features in some *Phytophthora*

*infestans* isolates from Algeria. In; *Proceedings of the Eleventh EuroBlight Workshop* (October 28-31, 2008, Hamar, Norway), PPO-Special Report n° 13: 237-341.

**Black W., Mastenbroek C., Wills W. R. and Peterson L. C.,** 1953. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity of *Solanum demissum* derivatives. *Euphytica* 2: 173-179.

**Blancard D., Montarry J.,** 2007. Quel est votre diagnostic? PHM. *Revue Horticole* 496 : 45-47

**Boccas B.,** 1979. La reproduction sexuelle chez les *Phytophthora*, ses voies et quelques unes de ses conséquences génétiques. *Travaux et documents de l'O. R. S. T. O. M.* 100 : pp 188.

**Brasier C.M.,**1990. The unexpected element: mycovirus involvement in the outcome of two recent pandemics, dutch elm disease and chesnut blight. *Pests, Pathogens and Plant Communities* (J.J. Burdon and S.R. Leather eds.), *Blackwell Scientific Publication, Oxford* pp. 289-307.

**Bourget D.,** 2008. Pomme de terre en Algérie, un potentiel à exploiter. *Potato planet* 10: 22-24.

**Bruck R. I., Fry W. F., Apple A. E.,** 1980. Effet of metalaxyl, an acylanine fungicide, on development stages of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 70: 597-601.

**Cavalier-Smith,** 1986. The Kingdom Chromista: Origin and systematics. *Progress on Physiological Research* Vol. 4: 309-347.

**Chmielarz M, Sobkowiak S, Debski K, Cooke DEL, Brurberg MB, Śliwka J,** 2014. Diver-sity of *Phytophthora infestans* from Poland. *Plant Pathology* 63: 203–2011.

**Christine D. S., Robert W. S., Fry W. E.,** 2000. Molecular Techniques and the mystery of potato late blight. *Potato Late Blight Pathogen:* 21-42.

**Chowdappa P., Kumar NBJ, Madhura S, Kumar MSP, Myers KL, Fry WE, Squires JN, Cooke DEL,** 2013. Severe outbreaks of late blight on potato and tomato in south India caused by recent changes in the *Phytophthora infestans* population. *Journal of phytopathology* 161: 49–58.

**Chowdappa P, Kumar NBJ, Madhura S, Kumar MSP, Myers KL, Fry WE, Cooke DEL,** 2015. Severe outbreaks of late blight on potato and tomato in south India caused by recent changes in the *Phytophthora infestans* population. *Plant pathology* 64: 191–199.

**Cohen, Y., Farkash S., Reshit Z., and Baider A.,** 1997. Oospore production of *Phytophthora infestans* in potato and tomato leaves. *Phytopathology* 87: 191-196.

**Cohen Y., Gisi U.,** 2007. Differential activity of carboxylic acid amide fungicides against various developmental stages of *Phytophthora infestans*. *Disease control and pest management. Phytopathology* 97:10-1274.

**Cooke DEL, Young V, Birch PRJ, Toth R, Gourlay F, Day JP, Carnegie S, Duncan JM,** 2003. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995–97). *Plant Pathology* 52: 181–92.

**Cooke DEL, Lees AK, 2004.** Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathology* **53**: 692–704.

**Cooke D. E. L., Lees A., Shaw D., Bain R., Cooke L., 2006.** Variation in aggressiveness in *Phytophthora infestans*. *British Potato Council* **282**: pp 47.

**Cooke DEL, Andersson B, Bakonyi J, Hansen JG, Lassen P, Lees A, 2010.** Eucablight – pathogen database update. In: *Proceedings of Twelfth Euroblight Workshop* (3–6 May 2010, Arras, France), PPO-Special Report no. **14**: 55–65.

**Cooke DEL, Cano LM, Raffaele S, Bain RA, Cooke LR, Etherington GJ, Deahl KL, Farrer RA, Gilroy EM, Goss EM, Grünwald NJ, Hein I, MacLean D, McNicol JW, Randall E, Oliva RF, Pel MA, Shaw DS, Squires JN, Taylor MC, Vleeshouwers VGAA, Birch PRJ, Lees AK, Kamoun S, 2012.** Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. *PLOS Pathogens* **8**: 1–14.

**Corbière R, Andrivon D, 2003.** Preparation of a simple pea medium for culturing *Phytophthora infestans*. <http://www.eucablight.org/EucaBlight.asp>.

**Corbière R, Rekad FZ, Galfout A, Andrivon D, Bouznard Z, 2010.** Phenotypic and genotypic characteristics of Algerian isolates of *Phytophthora infestans*. In: *Proceedings of Twelfth Euroblight Workshop* (3–6 May 2010, Arras, France), PPO-Special Report n° **14**: 133–146.

**Crosier W., 1934.** Studies in the biology of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Cornell Univ., agric. Experiment Memoir 155, 40 p.

**Day J. R., Shattock R. C., 1997.** Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology* **103**: 379-391.

**Davidse L.C.D., Looijen L.K., Turkensteen D., Van der Wal D., 1981.** Occurrence of metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *European Plant Protection Organisation bulletin* **15**: 403-409.

**Davidse L.C., Daniel D.L., Van Westen C.J., 1983.** Resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Journal of Plant Pathology* **89**: 1-20.

**Deahl KL, Inglis DA, DeMuth SP, 1993.** Testing for resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* isolates from Northwestern Washington. *American Potato Journal* **70**: 779–795.

**Drenth A., Janssen E. M., Govers F., 1995.** Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. *Plant Pathology* **44**: 86-94.

**Dubois L., Duvauchelle S., 2007.** Evolution du mildiou de la pomme de terre. *Phytoma- La défense des végétaux* **604** : 18-21.

**Duvauchelle S., Andrivon D., 1996.** Maladies à distribution géographique mondiale : Le mildiou et son agent *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *La pomme de terre*. Rousselle P., Robert Y., Croisnier J. C. ed. INRA et ITCF. France 607 pp.

- El-Ganainy SM, Tohamy AMM, Awad MA, Squires JN, Cooke DE**, 2013. The population dynamics of *Phytophthora infestans* in Egypt. In: *Proceedings of American Phytopathological Society (APS) meeting* (August 10-14, 2013, Austin, Texas, USA) **103**. DOI: 10.13140/RG.2.1.3041.7688.
- Erwin D.C., Ribeiro O.K.**, 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. pp 562.
- Field D., Eggert L., Metzgar D., Rose R., Wills C.**, 1996. Use of polymorphic short and clustered coding region microsatellites to distinguish strains of *Candida albicans*. *FEMS Immunol. Med. Mic.* **15**: 73-79.
- Fischer W., Schweizer P., Christ U., Mozinger E., Kovats K., Baer G., Binder A.**, 1988. Mechanisms in systemic induced resistance. *Phytoparasitica* **16**: 211.
- Flier WG, Turkensteen LJ**, 1999. Foliar aggressiveness of *Phytophthora infestans* in three potato growing regions in the Netherlands. *European journal of Plant Pathology* **105**: 381–388.
- Fontem DA, Olanyab OM, Tsopmbenga GR, Owona MAP**, 2005. Pathogenicity and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* isolates obtained from garden huckleberry, potato and tomato in Cameroon. *Crop Protection* **24**: 449–456.
- Frinking H.D., Davidse L.C., Limburg H.**, 1987. Oospore formation by *Phytophthora infestans* in host tissue after inoculation with isolates of opposite mating type found in the Netherlands. *Phytopathology* **81**: 1330-1336.
- Fry W. E., Goodwin S.D., Matuszak J.M., Spielman L.J., Milgroom M.G.**, 1992. Population genetics and intercontinental migration of *Phytophthora infestans*. *Annual Review of Phytopathology* **30**: 107-129.
- Fry W.E., Goodwin SB, Dyer AT, Matuzak JM, Drenth A, Tooley PW, Sujkowski Ls, Koh YJ, Cohen BA, Spielman LJ, Deahl KL, Inglis DA, Sandlan kP**, 1993. Historical and recent migration of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways and implication. *Plant Disease* **77**: 653-661.
- Fry WE, Goodwin SB**, 1997. Resurgence of the Irish potato famine fungus. *Bioscience* **47**: 363–371.
- Fry WE**, 2008. *Phytophthora infestans*: the plant (and *R* gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology* **9**: 385-402.
- Galfout A., Kedad A., Corbière R., Bouznad Z.**, 2010. Occurrence of late blight in Algeria during 2009 and evaluation of potato cultivars for resistance to *Phytophthora infestans*. *Proceeding of the 12<sup>th</sup> Euroblight Workshop*, Arras, (3–6 May 2010, Arras, France), PPO-Special Report n° **14**.
- Gaucher D., Duvauchelle S., Andrivon D.**, 1998. Mildiou de la pomme de terre-le champignon évolue, la lutte aussi. *Perspectives Agricoles* **236** : 1-20.

- Gisi U, Cohen Y**, 1996. Resistance to phenylamide fungicides: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Phytopathology* **34**: 549–572.
- Goodwin S. B., Spielman L. J., Matuszak J. M., Bergeron S. N. and Fry W. E.**, 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations on northern and Central Mexico. *Phytopathology* **82**: 955-961.
- Goodwin S.B., Cohen B.A., Fry W.E.**, 1994. Pantaglobal distribution of a single clonal lineage of Irish potato famine fungus. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* **91**: 11591-11595.
- Goodwin SB, Sujkowski LS, Dyer AT, Fry BA, Fry WE**. 1995. Direct detection of gene flow and probable sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in northern North America. *Phytopathology* **85**: 473–479.
- Goodwin SB, Smart CD, Sandrock RW, Deahl KL, Punja ZK, Fry WE**, 1998. Genetic change within populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada during 1994 to 1996: role of migration and recombination. *Phytopathology* **88**: 939–949.
- Gomez-Alpizar L., Carbone I., Ristaino J. B.**, 2007. An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene geologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America PNAS*. February 27, 2007, vol. 104, n° 3306-3311.
- Groves C.T., Ristaino J.B.**, 2000. Commercial fungicide formulations induce in vitro oospore formation and phenotypic change in mating type in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* **90**: 1201-1208.
- Grünwald N.J., Flier W.G.**, 2005. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**: 171-190.
- Grünwald N.J., Rubio-Covarrubios O.A., Fry W.E.**, 2000. Potato late blight management in the Toluca Valley: forecasts and resistant cultivars. *Plant. Dis.* **84**: 410-416.
- Hackett J.D., Yoon H.S., Reyes-Prieto S.Li.A., Rummele S.E., Bhattacharya D.**, 2007. Phylogenomic analysis supports the monophyly of cryptophytes and haptophytes and the association of rhizaria with chromalveolates. *Mol. Biol. Evol.* **24** (8): 1702-1713.
- Hamada W, Harbaoui K**, 2010. Monitoring *Phytophthora infestans* epidemics on potato in Tunisia using genetics and molecular tools. In: *Book of Abstracts Oomycete Molecular Genetics Network Congress* (6-8 June 2010, Toulouse, France), p. 100.
- Hammi A, Msatef Y, Bennani Aismaili AEL, Serrhini MN**, 2002. Mating type, Metalaxyl Resistance and Aggressiveness of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Morocco. *Phytopathology* **150**: 289–291.
- Hammond-Kosack K.E., Parker J.E.**, 2003. Deciphering plant-pathogen communication, fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr. Opin. Biotechnol.* **4**: 177-183.
- Harbaoui K, Hamada W, Vleeshouwers VGAA, Khammassy N, Harrabi M, van der Lee TAJ**, 2013. Characterisation of *Phytophthora infestans* isolates collected from potato and

tomato crops in Tunisia during 2006-2008. *Potato Research* **56**: 11–29. DOI: 10.1007/s11540-012-9228-3.

**Harbaoui K, Hamada W, Li Y, Vleeshouwers VGAA, van der Lee T.**, 2014. Increased difficulties to control late blight in Tunisia are caused by a genetically diverse *Phytophthora infestans* population next to the clonal lineage NA-01. *Plant Disease* **98**: 898–908.

**Harper J.T.**, Waanders E., Keeling P.J., 2005. On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes. In *J Syst Evol Microbiol.* **55** (Pt 1): 487-496.

**Harrison J.G.**, 1992. Effects of the aerial environment on late blight of potato foliage. *Plant Pathology* **41**: 384-416.

**Haverkort AJ, Boonekamp PM, Hutten R, Jacobsen E, Lotz LAP, Kessel GJT, Visser RGF, van der Vossen EAG**, 2008. Societal cost of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Research* **51**: 47-57  
Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C., Pegler D.N., 1995. *Ainsworth Bisby's Dictionary of the fungi, 8<sup>th</sup> edition*. CAB International, Wllingford, U.K., p. 356.

**Hermansen A, Hannukkala A, Hafskjold Nærstad R, Brurberg MB**, 2000. Variation in populations of *Phytophthora infestans* in Finland and Norway. *Plant Pathology* **49**: 11–22.

**Hohl H. R.**, 1983. Nutrition of *Phytophthora*. (pp41-54). In : Erwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S., and Tsao, P. H.(eds.); *Phytophthora, Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. *American Phytopathology Society, St. Paul, MN*. pp392.

**Hohl H. R. and Islin K.**, 1984. Strains of *Phytophthora infestans* Switzerland's with A2 mating type behaviour. *Transactions of the British Mycological Society* **83** : 529-530.

**Holmes S. J. I., Shannon A. G.**, 1984. Studies on metalaxyl-resistance in potato crops in south-West Scotland. *Plant Pathology* **33**: 516-519.

**Isaac S.**, 1992. Fungal-Plant Interaction. Chapman and Hall, 2-6 Boundary Row, London. pp. 441.

**Jmour W, Hamada W**, 2006. First report of A2 mating type of *Phytophthora infestans* in Tunisia using molecular markers and some observations on its metalaxyl resistance. *Tunisian Journal of Plant Protection* **1**: 85–91.

**Judelson H. S and Roberts S.**, 1999. Multiple loci determining insensitivity to phenylamide fungicide in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* **89** : 754-759.

**Kadish D., Cohen Y.**, 1988. Estimation of metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* **78**: 915-919.

**Kildea S, Cooke LR, Quinn L, Armstrong C, Little G, Hutton F, Dowley DJ, Griffin D**, 2010. Dramatic changes within the Irish *Phytophthora infestans* population during the 2008-2009 seasons. In: *Proceedings of Twelfth Euroblight Workshop* (3–6 May 2010, Arras, France), PPO- Special Report n° **14**: 147–150.

**Knapova G., Gisi U.**, 2002. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology* **51**(5): 641-653.

**Ko W.H.**, 1988. Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology* **26**: 57-73.

**Krause R.A., Massie L.B., Hyre R.A.**, 1975. Blightcast, a computerised forecast of potato late blight. *Plant Disease* **59**: 95-98.

**Kroon L.P.N.M., Bakker F.T., van den Bosh G.B.M., Bonants P.J.M., Flier W.G.**, 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genet. Biol.* **41**: 766-782.

**Laing C.**, 1998. Le mildiou de la pomme de terre. Bulletin d'information de la Division de la Gestion des Demandes d'Homologation et de l'information, Agence de Réglementation de la lutte parasitaire, Canada, Juin 1996.

**Lebreton L.**, 1998. Structure et evolution des populations françaises de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, agent du mildiou de la pomme de terre et de la tomate. Thèse Sciences Biologiques. Université de Rennes I, 174 p.

**Lees A.K., Wattier R., Shaw D.S., Sullivan L., Williams N.A., Cooke D.E.L.**, 2006. Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathology* **55**: 311-319.

**Lees AK, Cooke DEL, Stewart JA, Sullivan L, Williams NA, Carnegie SF**, 2009.

*Phytophthora infestans* population changes: implications. In; *Proceedings of the Eleventh EuroBlight Workshop* (October 28-31, 2008, Hamar, Norway), PPO-Special Report n° **13**: 55-60.

**Lees AK, Stewart JA, Lynott JS, Carnegie SF, Campbell H, Roberts AMI**, 2012. The effect of a dominant *Phytophthora infestans* genotype (13\_A2) in Great Britain on host resistance to foliar late blight in commercial potato cultivars. *Potato Research* **55**: 125-34.

**Legard DE, Lee TY, Fry WE**, 1995. Pathogenic specialization in *Phytophthora infestans*: aggressiveness on tomato. *Phytopathology* **85**: 1362-1367.

**Lehtinen A, Hannukkala A**, 2004. Oospores of *Phytophthora infestans* in soil provide an important new source of primary inoculum in Finland. *Agricultural and Food Science* **13**: 399-410.

**Lehtinen A, Hannukkala A, Andersson B, Hermansen A, Le VH, Naerstad R, Brurberg MB, Nielsen BJ, Hansen JG, Yuen J**, 2008. Phenotypic variation in Nordic populations of *Phytophthora infestans* in 2003. *Plant Pathology* **57**: 227-234.

**Lehtinen A., Andersson B., Le. V. H., Naerstad R., Rastas M., Ketoja E., Hannukkala A.O., Hermansen A., Neilsen B.J., Hansen J.G., Yuen J.**, 2009. Aggressiveness of *Phytophthora infestans* on detached potato leaflets in four Nordic countries. *Plant Pathology* **58**(4) : 690-701.

**Lepoivre P.**, 2003. Phytopathologie, Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. De Boeck Université, *Les presses Agronomique de Gembloux Bruxelles* : 427 p.

**Li Y, van der Lee TAJ, Evenhuis A, van den Bosch GBM, van Bekkum PJ, Förch MG, van Gent-Pelzer MPE, van Raaij HMG, Jacobsen E, Huang SW, Govers F, Vleeshouwers VGAA, Kessel GJT**, 2012. Population dynamics of *Phytophthora infestans* in the Netherlands reveals expansion and spread of dominant clonal lineages and virulence in sexual offspring. *Genes Genomes Genet* **2**: 1529–1540.

**Li Y, van der Lee T, Zhu JH, Jin GH, Lan CZ, Zhu SX, Zhang RF, Liu BW, Zhao ZJ, Kessel G, Huang SW, Jacobsen E**, 2013. Population structure of *Phytophthora infestans* in China - geographic clusters and presence of the EU genotype Blue\_13. *Plant Pathology* **62**: 932–942.

**Malcolmson J.F., Black W.**, 1966. New R genes in *Solanum demissum* and their complementary races of *Phytophthora infestans*. *Euphytica* **15**: 199-203.

**Mariette N, Mabon R, Corbière R, Boulard F, Glais I, Marquer B, Pasco C, Montarry J, Andrivon D**, 2016. Phynotypic and genotypic changes in French populations of *Phytophthora infestans*: are invasive clones the most aggressive? *Plant Pathology* **65**: 577–586.

**Martens C., Vandepoele K., Van de Peer Y.**, 2008. Whole-genome analysis reveals molecular innovations and evolutionary transitions in Chromalveolate species. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **105**: 3427-3432.

**Miller JS, Hamm PB, Johnson DA**, 1997. Characterization of the *Phytophthora infestans* population in the Columbia Basin of Oregon and Washington from 1992 to 1995. *Phytopathology* **87**: 656–660.

**Montarry J.**, 2007. Réponse adaptative des populations de *Phytophthora infestans*, agent du mildiou de la pomme de terre, au déploiement en culture de son hôte *Solanum tuberosum*. Thèse Doctorat en Biologie et Agronomie de l'École Nationale Supérieure Agronomique (ENSAR) de Rennes. France. 177 p.

**Montarry J, Glais I, Corbière R, Andrivon D**, 2008. Adaptation to the most abundant host genotype in an agricultural plant-pathogen system--potato late blight. *Evolutionary Biology* **21**: 1397–1407.

**Morgante M., Olivieri A.M.**, 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* **3** (1): 175-182.

**Naerstad R, Sharma SS, LE VH, Elameen A, Brurberg MB**, 2014. Potato late blight forecasting and initial inoculums sources in Norway. In: *Proceedings of the Fourteen EuroBlight Workshop* (May 12-15, 2013, Limassol, Cyprus), PPO-Special Report n°. **16**: 41–49.

**Najimi B., El Jaafari S., Jlibène M., Jacquemin J.M.**, 2003. Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* **7**(1) : 17-35.

**Niederhauser J. S.**, 1991. *Phytophthora infestans* : the Mexican connection. In : Lucas, J. A., Shattock, R. C., Shaw, D. S., Cook, L. R., eds. *Phytophthora*, 25-45, Cambridge University Press, Cambridge, U. K.

- O’Sullivan E., Dowley L.J.**, 1991. A note on the occurrence of the A2 mating type and self-fertile isolates of *Phytophthora infestans* in the Republic of Ireland. *Irish J. Agric. Res.* **30**: 67-69.
- Oyarzun P J, Pozo A, Ordoñez ME, Doucett K, Forbes GA**, 1998. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. *Phytopathology* **88**: 265–271.
- Pappas A. C.**, 1985. Metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans* on greenhouse tomatoes in Greece. *Plant Pathology* **34**: 293-296.
- Parlevliet J.E.**, 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Ann. Rev. Phytopathol.* **17**: 203-222.
- Person C.**, 1966. Genetic polymorphism in parasitic systems. *Nature* **212**: 266-267.
- Pieterse C.M.J., Dewit P.J.G.M, Govers F.P.M.**, 1992. Molecular aspects of the potato-*Phytophthora infestans* interaction. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **98**: 85-92.
- Radtke W., Rieckmann W.**, 1991. Maladies et ravageurs de la pomme de terre. Th. Mann. Gelsenkirchen-Buer. Review. *Plant Pathol.* **41** : 384-416.
- Rapilly F.**, 1991. L'épidémiologie en pathologie végétale. Mycoses aériennes. INRA Edition, Paris.
- Rekad F.Z.**, 2009. Caractérisation des isolats de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, agent causal de la maladie du mildiou de pomme de terre et de la tomate dans la région nord-ouest d’Algérie. Mémoire de Magister. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem 99 p.
- Reuveni M., Eyal H., Cohen Y.**, 1980. Developpement of resistance to metalaxyl in *Pseudoperonospora cubensis*. *Plant Disease* **64**: 1108-1109.
- Rey Y., Costes C.**, 1965. La physiologie de la tomate : Etude bibliographique. Ed. INRA, Paris. 112 p.
- Rousselle-Bourgeois F., Rousselle P.**, 1996. Amélioration génétique. Dans : *La pomme de terre* (Rousselle P., Robert Y., et Crosnier J.C. eds.), pp. 125-159. INRA Editions, Paris.
- Rousselle B.**, 2008. Algérie, essai en plein désert. *La pomme de terre française* **558**, 46-47
- Rullich G., Schober B.**, 1988. Auftreten und verbeitung des A2 paarungstyps von *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in der Bunderrepublik Deutschland. *Der Kartoffelbau* **39**: 244-246.
- Runno-Paurson E, Kiiker R, Joutsjoki T, Hannukkala A**, 2016. High genotypic diversity found among population of *Phytophthora infestans* collected in Estonia. *Fungal biology* **120**: 385–392. doi:10.1016/j.funbio.2015.11.008
- Savazzini F, Galletti S**, 2015. Phenotypic and genotypic characterization of Italian *Phytophthora infestans* isolates. *Phytopathologia Mediterranea* **54**: 524–530.

**Schwinn F. J., Margot P.**, 1991. Control with chemicals. Advances in Plant Pathology. *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potatoes. Ed Ingran and Williams. Academic Press, London. 255 pp.

**Sedigui M., Carroll R. B., Morehart A.L.**, 1997. First report from Morocco of *Phytophthora infestans* isolates with metalaxyl resistance. *Plant Disease* **81**: 831.

**Sedigui M, Carroll RB AL, Morehart AL, Evans TA, Kim SH, Lakhdar R, Arifi A**, 2000. Genetic structure of the *Phytophthora infestans* population in Morocco. *Plant Disease* **84**: 173–176.

**Shakya SK, Goss EM, Dufault NS, van Bruggen AH**, 2015. Potential effects of diurnal temperature oscillations on potato late blight with special reference to climatic change. *Phytopathology* **105**: 230–238.

**Shaw D. S.**, 1987. The breeding system of *Phytophthora infestans*: the role of the A2 mating type. In Genetics and Plant Pathogenesis. Day, P. R., and Jellis, G. J. Eds, Boston, *Blackwell Scientific Publications*, 161-174.

**Sliwka J., Zimnoch-Guzowska E.**, 2013. Resistance to late blight in potato. In Translational Genomics for Crop Breeding. Biotic Stress. R. K. Varshney, eds. Wiley-Blackwell Publishers, **1**: 221-240.

**Smoot, J. J., Gough, F. J., Lamey, H. A., Eichenmuller, J. J. and Gallegly, M. E.**, 1958. Production and germination of oospores of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* **48** : 165-171.

**Spielman, L. J.**, 1991. Isozymes and the population genetics of *Phytophthora infestans*. In: Lucas J. A., Shattock R. C., Shaw D. S. and Cooke L. R. (Eds) , *Phytophthora*. Cambridge University Press, Cambridge, British Mycological Society pp: 231-241.

**Sjöholm L, Andersson B, Högberg N, Widmark A-K, Yuen J**, 2013. Genotypic diversity and migration patterns of *Phytophthora infestans* in the Nordic countries. *Fungal Biology* **117**: 722–730.

**Staub, T., Dahmen H., and Shwinn, F.**, 1980. Effects of ridomil on the development of *Plasmopara viticola* and *Phytophthora infestans* on their host plants. *Journal of Plant Disease and Protection* **87** : 83-91.

**Stevenson W.R., Loria R., Franc G.D., Weingartner D.P.**, 2001. *Compendium of potato diseases*. Second edition, APS, Minnesota, USA.

**Stroud JA, Shaw DS, Hale MD, Steele KA**, 2016. SSR assessment of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in British gardens demonstrates high diversity but no evidence for host specialization. *Plant Pathology* **65**: 334–341.

**Suassuna ND, Maffia LA, Mizubuti ESG**, 2004. Aggressiveness and host specificity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* **53**: 405-413.

- Therrien C.D., Ritch D.L., Sujkowski L.S., Spielman L.J., Fry W.E., Dagget S.S., Sim J.H., Tooley P.W.**, 1993. *Phytophthora infestans* in Poland from 1987-1989; nuclear DNA content, mating type distribution and response to metalaxyl. *J. Phytopathol.* **139**: 68-80
- Thurston H.D., Schltz O.**, 1981. Late blight in compendium of potato disease. Hooker Eds. APS Press Michigan (USA) 40-42.
- Tian Y, Sun J, Li H, Wang G, Ma Y, Liu D, Quan J, Shan W**, 2015. Dominance of a single clonal lineage in the *Phytophthora infestans* population from northern Shaanxi, China revealed by genetic and phenotypic diversity analysis. *Plant Pathology* **64**: 200–206.
- Tria M., Chehat F.**, 2013. Typologie des producteurs de pomme de terre dans la région d'Ain Defla. *Les cahiers du CREAD* **103** : 136 p.
- Trout C. L., Ristaino J.B., Madritch M., Wangsomboon dee T.**, 1997. Rapid detection of *Phytophthora infestans* in late blight-infected potato and tomato using PCR. *Plant Disease.* **89**: 1042-1048.
- Turkensteen L.J., Flier W.G., Wannigen R., Mulder A.**, 2000. Production, survival and infectivity of oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant pathology* **49**: 688-696.
- Umaerus V.**, 1963. Field resistance to late blight in potatoes. In Akerberg and Hagberg (ed.). *Recent plant breeding research*. Svalof. 1946-1961. Stockholm. 233-235 p.
- Van der Plank J.E.**, 1968. Disease Resistance in Plants. Academic Press, New York.
- Van der Zaag D.E.**, 1956. Overwintering en epidemiologie van *Phytophthora infestans*, tevens enige nieuwe bestrijdingsmogelijkheden. *Tijdschrift over Plantenziekten* **62**: 89-156
- Wastie R.L.**, 1991. *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Breeding for resistance. In: Ingram D.S., Williams P.H., (Eds.), *Advances in Plant Pathology*, vol 7, Academic Press, London, San Diego. P. 193-224.
- Watson I.A.**, 1970. Changes in virulence and population shifts in plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* **8**: 209-230.
- White S, Shaw D**, 2009. Resistance of sarpo clones to the new strain of *Phytophthora infestans*, Blue-13. In: *Proceedings of the Eleventh EuroBlight Workshop* (October 28-31, 2008, Hamar, Norway), PPO-Special Report n° **13**: 61–69.
- Yoshida K., Schuenemann V., Cano C., Pais P., Mishra B.**, 2013. The rise and fall of *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. *Elife* **2**: e00731
- Zentmyer G.A.**, 1983. The world of *Phytophthora*, its biology, taxonomy, ecology and pathology (Ed. by Erwin D.C., Bartnicki-Garcia, S., Tsao P.H.). *American Phytopathological Society, St. Paul, USA* pp. 1-8.
- Zwankhuuijn, M. J.** 1998. Potato late blight epidemics and population structure of *Phytophthora infestans*. PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, Netherlands. 147 pp.

**Publication internationale**



British Mycological  
Society promoting fungal science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/funbio](http://www.elsevier.com/locate/funbio)



# Characterization of *Phytophthora infestans* populations in northwestern Algeria during 2008–2014

Fatma Zohra REKAD<sup>a,\*</sup>, David Edward Llewelyn COOKE<sup>b</sup>, Ivana PUGLISI<sup>c</sup>,  
Eva RANDALL<sup>b</sup>, Yamina GUENAOUI<sup>a</sup>, Zouaoui BOUZNAD<sup>d</sup>, Maria EVOLI<sup>c</sup>,  
Antonella PANE<sup>b</sup>, Leonardo SCHENA<sup>e</sup>, Gaetano MAGNANO DI SAN LIO<sup>e</sup>,  
Santa Olga CACCIOLA<sup>c,\*\*</sup>

<sup>a</sup>Département d'Agronomie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid Ibn Badis, Site 3-EX ITA, 27000, Mostaganem, Algeria

<sup>b</sup>The James Hutton Institute, Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, United Kingdom

<sup>c</sup>Dipartimento di Agricoltura Alimentazione e Ambiente, Università degli Studi di Catania, Via Santa Sofia, 100, 95123, Catania, Italy

<sup>d</sup>Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), 16200, El Harrach, Alger, Algeria

<sup>e</sup>Dipartimento di Agraria, Università Mediterranea di Reggio Calabria, Feo di Vito, 89122, Reggio Calabria, Italy

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 8 August 2016

Received in revised form

2 January 2017

Accepted 19 January 2017

Available online 6 February 2017

Corresponding Editor:

Gordon William Beakes

### Keywords:

Late blight

Mating type

Metalaxyl

Potato

SSR markers

Tomato

## ABSTRACT

A total of 161 *Phytophthora infestans* isolates, collected from infected potato and tomato plants during 2008–2014, were characterized based on mating type, metalaxyl sensitivity and polymorphism at 12 simple sequence repeat (SSR) loci, in order to investigate the population of *P. infestans* in the north-west of Algeria, an emerging potato production region. The majority of isolates were of A2 mating type (112 isolates). A high percentage (89 %) of resistance to metalaxyl among isolates was detected. The metalaxyl resistant phenotype was present in both mating types with a higher percentage in A2 mating type isolates. SSR-based genotypic analysis of *P. infestans* population showed a low diversity. Genotype 13\_A2 was the predominant in the population with a frequency of 67 % followed by 2\_A1 (21 %) and 23\_A1 (5 %). Genotype 23\_A1 was detected only in tomato and potato isolates collected in 2013 and 2014.

© 2017 British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Late blight, caused by the oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, is considered to be the most important potato

disease in the world. Under favourable conditions it can destroy the whole potato haulm and cause considerable yield loss. *P. infestans* is responsible of \$ 6.7 billion annually in potato, and crop losses up to 100 % in tomato (Chowdappa et al. 2015). In

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [fatifz2001@yahoo.fr](mailto:fatifz2001@yahoo.fr) (F.Z. Rekad), [olgacacciola@unict.it](mailto:olgacacciola@unict.it) (S.O. Cacciola).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2017.01.004>

1878-6146/© 2017 British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

the 19th century this pathogen caused the famous Great Famine in Ireland resulted in the death of approximately one million and the emigration of a million more people (Fry & Godwin 1997). Since this period, migration probably within exported seed tubers, allowed the late blight pathogen to spread throughout the world (Fry et al. 1993). As a consequence of the latest of these movements, populations of *P. infestans* have changed in several North European countries during the 1980s. Several studies on characterization of *P. infestans* showed that the 'old' European populations of the pathogen were rapidly being replaced by 'new' populations, genetically different and probably originated from central Mexico (Fry et al. 1993). Across many potato growing regions, populations of *P. infestans* have been dominated by clonal lineages that are defined using a combination of genotypic and phenotypic characters (Cooke & Lees 2004). A successful A2 mating type, metalaxyl resistant lineage with increased aggressiveness and virulence that originated in Europe was named genotype 13\_A2 (Cooke et al. 2012; Lees et al. 2012). It was first reported in the Netherlands and Germany in 2004, Poland in 2006, 2008 and 2009 (Chmielarz et al. 2014) and reached 80 % of the population in Great Britain in 2008 (Cooke et al. 2012). The 13\_A2 lineage was responsible for severe late blight outbreaks on potato and tomato in southern India and has replaced the prior population represented by the US-1 and other genotypes (Chowdappa et al. 2015).

In Algeria, late blight is a very common disease on potato, but it was also reported on tomato in some areas of the country and it is controlled through extensive use of chemical fungicides, especially metalaxyl, as in many other regions in the world. In north-western Algeria, an emerging potato production region, this disease reached epidemic proportions in 2007–2008, probably due to the favourable weather conditions. Consequently, heavy yield losses were recorded despite the widespread use of late blight fungicides and potato production has decreased by 30 % in this period.

In Algeria, potato and tomato are the most important vegetable crops, grown on 156 176 and 22 646 ha, with an annual production of 4.67 and 1 million tones, respectively (FAOSTAT 2014). Potato is planted in three seasons, from Aug. to Jun. The late season, from Jan. to Jun. is the main cropping period in all production regions, but early and very early crops are typical practices in coastal regions. The majority of seed potato tubers are imported from European countries, especially the Netherlands, France, Denmark and Scotland. Conversely, tomato is grown all year round in greenhouses and open fields. In some areas, potato and tomato are grown in adjacent fields increasing the risk of the spread of late blight from one crop to another. In addition, some cultural practices, such as absence of crop rotation, sprinkler irrigation, and the widespread use of susceptible cultivars may also promote early attacks. The practice of leaving infected potato tubers in fields after harvest could also be a potential source of primary inoculum for late blight epidemics. A study of some *P. infestans* isolates collected from the north-western Algeria during 2008 revealed the appearance of metalaxyl resistance and the presence of the two mating types, A1 and A2, with a high prevalence of A2 (Corbière et al. 2010). Thus, monitoring pathogen insensitivity, especially to systemic fungicides, is an important aspect of disease management (Gisi & Cohen 1996). The development of *P. infestans* isolates' resistance to metalaxyl was reported also in many regions of the

world (Deahl et al. 1993; Gisi & Cohen 1996; Hammi et al. 2002; Cooke et al. 2010; Hamada & Harbaoui 2010; Chmielarz et al. 2014).

*Phytophthora infestans* is a heterothallic, hemi-biotrophic oomycete with two mating types (A1 and A2). The presence of both mating types enables sexual reproduction, which generates genotypic diversity in the pathogen population leading to increased adaptability. Another effect of sexual reproduction is the production of oospores, which are highly tolerant to adverse environmental conditions and can survive in soil between growing seasons and over several years (Turkensteen et al. 2000).

Before 2008 there were no data on Algerian *P. infestans* population characteristics. The first report of the presence of the A1 and A2 mating types in Algeria (Corbière et al. 2010) indicates that all A2 *P. infestans* isolates collected during 2007–2008 have highly complex virulence patterns. Despite the importance of late blight disease on potato and tomato cultivation in Algeria, very little is known about the characteristics of the *P. infestans* population in this country.

The aim of this study was to characterize *P. infestans* populations in order to understand the repeated epidemics recorded in the north-western Algeria region since 2008 and thus develop new efficient late blight control strategies. Phenotypic and genotypic traits were analyzed to determine: (i) the mating type distribution in the Algerian population; (ii) the population level of metalaxyl sensitivity; (iii) their genotypic diversity using microsatellite markers.

## Materials and methods

### Sampling and isolations

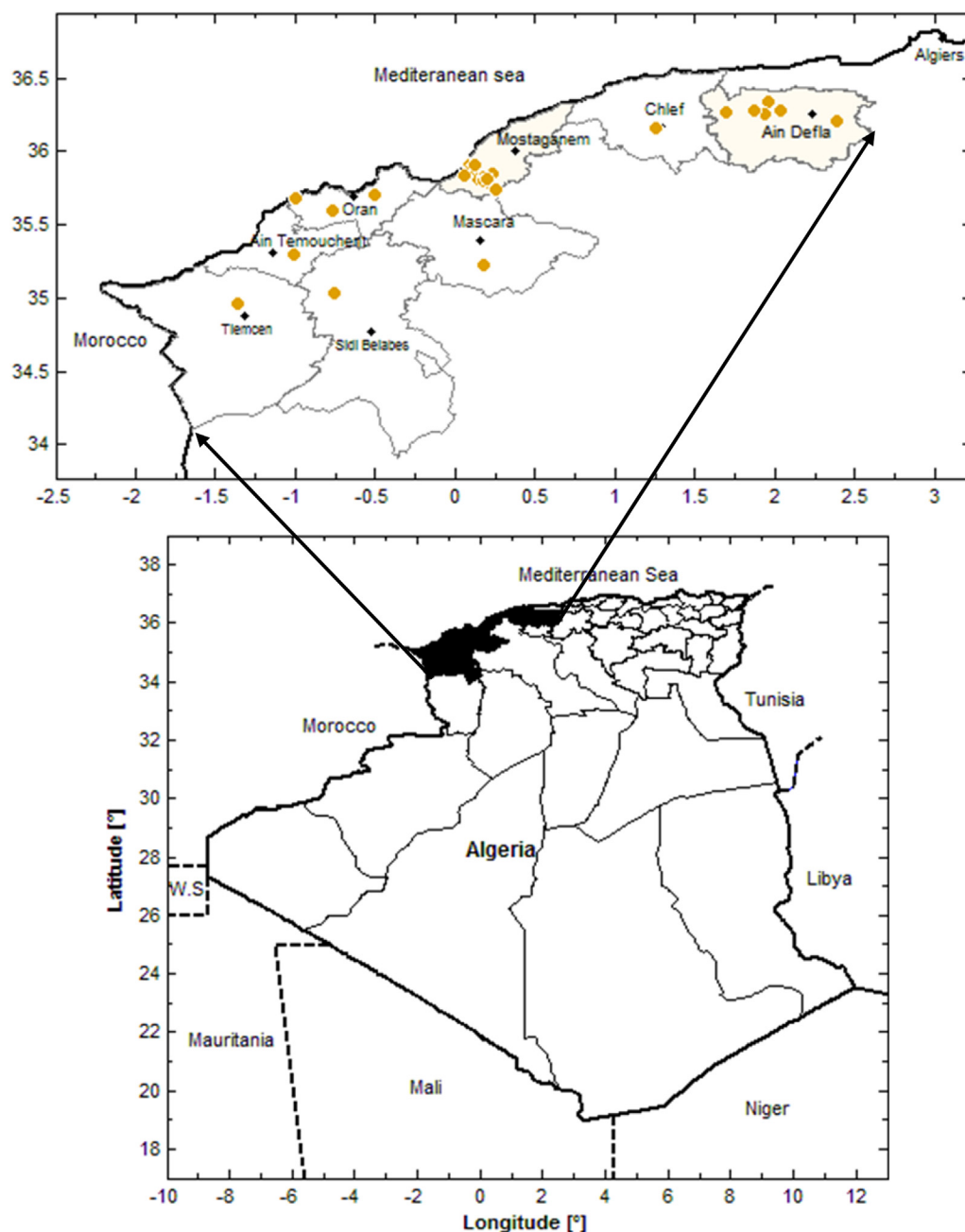
Samples were collected during 2008–2014 from potato crops grown in the field and tomatoes grown in the field and greenhouses, located in different sites in north-western Algeria (Fig 1). Two most important potato production areas from this region, Mostaganem (coastal region) and Ain Defla (interior region) were chosen to compare the populations of *Phytophthora infestans* for mating type ratio, level of metalaxyl resistance and genotypes frequency.

One to four fields were sampled per site at the onset of the epidemic and at 15–20 d thereafter. Five to ten samples with a single lesion were randomly collected from each field. Samples were packed individually in paper bags and maintained at 4 °C until isolation.

*Phytophthora infestans* was isolated from potato and tomato leaves, stems, fruits and tubers showing typical late blight symptoms by placing small pieces of infected tissue under potato tuber slices of susceptible cultivar Spunta. After four to five days of incubation at 18 °C in darkness, small tufts of mycelium growing above the potato slice were transferred to Petri dishes containing pea agar medium (protocol from Corbière & Andrivon 2003) amended with rifamycin (30 mg L<sup>-1</sup>) and ampicillin (200 mg L<sup>-1</sup>). Pure cultures were obtained by repetitive transfers on pea agar medium.

### Mating type

The mating type of the isolates was determined by pairing them with reference isolates of A1 and A2 mating type



**Fig 1 – The Survey map indicating locations where tested isolates were taken during 2008–2014 in northwest of Algeria. The position (longitude and latitude) of each sampling site was determined using GPS (Global Positioning System).**

(P13-06 and P27-05, respectively) on pea agar medium. Mycelial plug from an active growing colony of the test isolate was placed on the opposite side (2 cm apart) of the plug of either the A1 or A2 tester isolate. After 11–15 d of incubation at 15 °C in the dark, plates were examined microscopically for the presence of the oospores in the hyphal interaction area between the isolates paired (Cooke et al. 2003). Isolates that produced oospores with the A1 tester but not with the A2 isolate were designated as A2. Isolates that formed oospores when paired with the A2 tester isolate but not with the A1 isolate were designated as A1.

#### **Metalaxyl resistance test**

The sensitivity of 92 *Phytophthora infestans* isolates was assessed *in vivo* using potato leaf discs (Hermansen et al. 2000). Six leaf discs of the susceptible cultivar Spunta were floated abaxial side up in Petri plates each containing distilled water amended with metalaxyl (Ridomil 25 WP, Novartis experimental compound) at different concentrations (0, 10 and 100 mg L<sup>-1</sup>). Leaf discs for each plate were inoculated with a 20 µL droplet of the sporangial suspension of each isolate prepared as previously described by Andrivon et al. (2007).

**Table 1 – Mating type, metalaxyl resistance and genotypes of *Phytophthora infestans* isolates in the north-west of Algeria from 2008 to 2014.**

Sampling year	Number of isolates								
	A1	A2	Metalaxyl			Clonal lineage			
			Sensitive	Intermediate	Resistant	13_A2	2_A1	23_A1	Misc
2008–2012	19	27	5	2	19	4	10	0	8
2013	10	53	1	0	24	48	3	1	3
2014	20	32	0	2	39	26	12	5	0
<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>112</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>82</b>	<b>78</b>	<b>25</b>	<b>6</b>	<b>11</b>

After 7 d of incubation at 18–20 °C, the sensitivity to metalaxyl was determined by the isolates' ability to grow and sporulate on the leaf discs. Isolates sporulating on the discs floating on water containing 100 mg L<sup>-1</sup> metalaxyl were rated as resistant (R), those on 10 mg L<sup>-1</sup> were rated as intermediate (I) and those that sporulated only on water were considered sensitive (S).

#### DNA extraction

For DNA extraction, 117 isolates were grown individually in pea broth. After 20 d of incubation at 15 °C, mycelia of isolates were rinsed with sterile distilled water, harvested by filtration and stored at -20 °C. Genomic DNA was extracted from 10 mg of dry mycelium using the Power Plant Pro DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, USA). Quality and quantity of extracted DNA samples were evaluated using a DNA Quant-it assay kit (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) and by electrophoresis in 1 % agarose gels containing SYBR<sup>®</sup> Safe (Invitrogen, Life Technologies, USA) DNA gel stain.

#### Simple sequence repeat marker analysis

Polymorphic simple sequence repeat (SSR) regions of Algerian *Phytophthora infestans* isolates were amplified using primers for loci Pi02, Pi4B, G11, Pi04, Pi63, Pi70, D13, SSR2, SSR4, SSR6, SSR8, and SSR11. The Type-it Microsatellite PCR kit (QIAGEN) was used following previously published methods (Li et al. 2013). Samples were analyzed using an ABI 3730 capillary DNA sequencer according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). The peak size was determined against a GeneScan 500 LIZ standard and alleles were scored using GeneMapper<sup>®</sup> Software v. 3.7.

#### Data analysis

The genetic diversity of representative selection of Algerian *Phytophthora infestans* isolates chosen after clone correction was analyzed according to the major allele frequency, number of alleles per locus and gene diversity. Based on SSR data, these basic statistics were determined by Matlab programming. Gene diversity (H) was calculated for each locus according to the following formula (Anderson et al. 1993) and implemented under Matlab as m-function named (*pic.m*):

$$H = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

where *k* is the total number of alleles detected per SSR marker and *p<sub>i</sub>* is the sum of the *i*-th allelic frequency of each microsatellite locus for the genotypes.

An H value equal to 0 means no diversity at that locus and 1 means highest possible diversity.

## Results

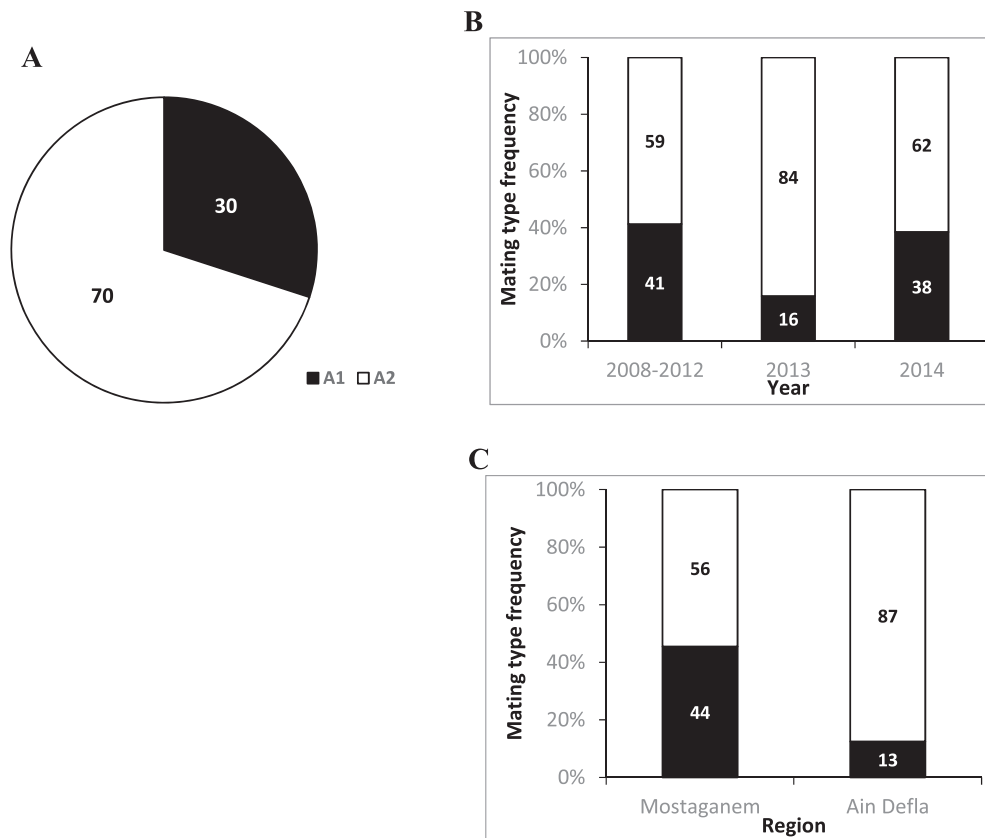
### Mating type

A total of 161 isolates of *Phytophthora infestans* were obtained from 2008 to 2014 (Table 1). Most of them were collected in 2013 and 2014 years and 45 isolates were collected during the 2008–2012 period (Supplementary information, Table S1).

Both A1 and A2 mating type isolates were detected among Algerian isolates of *P. infestans* population collected from north-western Algeria over the period of 2008–2014. Of the 161 isolates tested, 112 were A2 mating type (70 %), 49 were A1 mating type (30 %) (Fig 2A). The A1:A2 frequency ratios during the sampling years were 0.4:0.6 in 2008–2012, 0.15:0.85 in 2013 and 0.4:0.6 in 2014. Interestingly, all isolates from tomato were A1 mating type except one (BT16) being an A2 mating type isolate collected from Mostaganem in 2013. Conversely, the A2 mating type prevailed among isolates from potato in all years (Fig 2B). Finally, both A1 and A2 mating types were sometimes found in the same field in both the Mostaganem and Ain Defla regions. A higher proportion of A2 mating type was found in isolates collected from Ain Defla with 0.1:0.87 (A1:A2) frequency ratio. In contrast, the approximate 0.45:0.54 (A1:A2) ratio of the two mating type was found in isolates collected from Mostaganem region (Fig 2C).

### Metalaxyl resistance

Among the 92 isolates tested for their response to metalaxyl, 89 % (*n* = 82) were classified as resistant, 7 % (*n* = 6) as sensitive and 4 % (*n* = 4) as intermediate (Fig 3A). The metalaxyl resistant phenotype was the most common in all years (Fig 3B). During the period 2008–2012, 73 % (*n* = 19) of isolates tested were resistant, the remaining isolates were both sensitive (19 %, *n* = 5) and intermediate (8 %, *n* = 2). In 2013 and 2014, similar proportions of resistant isolates were found, 96 % (*n* = 24) and 95 % (*n* = 39), respectively. Isolates of both A1 and A2 mating types were found to be metalaxyl resistant



**Fig 2 – Frequency of mating types (A1, A2) among *Phytophthora infestans* isolates collected from the northwestern Algeria during 2008–2014 (n = 161). (A) For all isolates. (B) Depending on the sampling year. (C) With respect to the region of sampling (Mostaganem and Ain Defla).**

but a greater proportion of the A2 mating type isolates were resistant (Fig 3C). Finally, a higher proportions of resistance to metalaxyl among isolates collected from Mostaganem and Ain Defla were found (93 %, n = 42 and 86 %, n = 32, respectively) (Fig 3D).

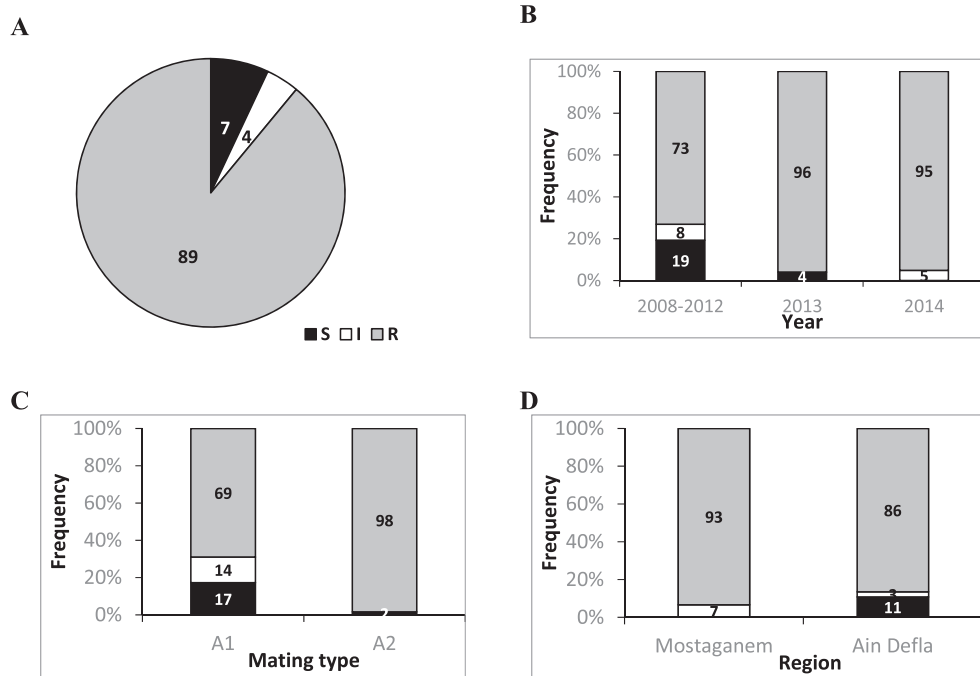
#### SSRs analysis

A total of 57 alleles were detected over the 12 SSR loci, ranging from 2 (at loci Pi70 and SSR2) to 12 (at locus G11) (Table 2). Alleles 173 from locus SSR2 and 244 from locus SSR6 were detected in all tested *Phytophthora infestans* isolates. Some alleles were detected only once among all tested isolates (frequency of 0.015). The H value ranged between 0.162 (locus SSR2) and 0.823 (locus G11) (Table 2).

The SSR fingerprints from the 117 isolates of *P. infestans* subject to SSR analysis were compared to profiles from other lineages (e.g. Cooke et al. 2012; Li et al. 2012) and categorized into four major types. The most frequent of these was 13\_A2 (n = 78) with other types 2\_A1 and 23\_A1 genotypes detected 25 and 6 times, respectively (Fig 4A). The genotype and expected mating type corresponded in every case. Finally, eight ‘Misc’ (abbreviation of miscellaneous) isolates that did not group within any known lineage were detected (Fig 4A) and were of mating types, A1 (n = 6) and A2 (n = 2). Genotype

2\_A1 was the predominant (10 isolates) in *P. infestans* isolates collected from 2008 to 2012 (Fig 4B), followed by ‘Misc’ and 13\_A2 genotypes (five and four isolates, respectively). Conversely, genotype 13\_A2 was the predominant one in the population sampled in 2013 and 2014 (48 and 26 isolates, respectively). Finally, the genotype 23\_A1 was found once in an isolate (BT9) collected on tomato from Mostaganem in 2013 and 5 times on potato from Mostaganem in 2014 (Fig 4B). The population of *P. infestans* in this region showed a higher genotypic diversity than the population in Ain Defla and other regions from the north-west of Algeria (Figs 4C and 5).

Minor variation within the fingerprints of isolates of the 13\_A2 clonal lineage were identified and defined as subclonal lineages, 13\_A2\_1, 13\_A2\_2, etc (Fig 6A). This variation was primarily at loci G11, D13 and SSR4. The 13\_A2\_2 subclonal lineage was the predominant, represented by 50 isolates followed by 13\_A2\_22 (8 isolates) and 13\_A2\_1 (6 isolates). In addition, other subclonal genotypes (13\_A2\_50, 13\_A2\_61, 13\_A2\_68, 13\_A2\_86 and 13\_A2\_101) were found but with low frequencies (Fig 6A). All of the eight subclonal lineages detected were found in Mostaganem region with the dominance of 13\_A2\_2 which was also the predominant in Ain Defla. In this last region, three subclonal genotypes, 13\_A2\_68, 13\_A2\_86 and 13\_A2\_101 were absent (Fig 6B).



**Fig 3 – Metalaxyl resistance among *Phytophthora infestans* isolates collected from the northwestern Algeria during 2008–2014. (A) For all tested isolates (n = 92). (B) With respect to the sampling year. (C) With respect to mating type. (D) With respect to two regions (Mostaganem and Ain Defla). S: sensitive, I: intermediate, R: resistant.**

## Discussion

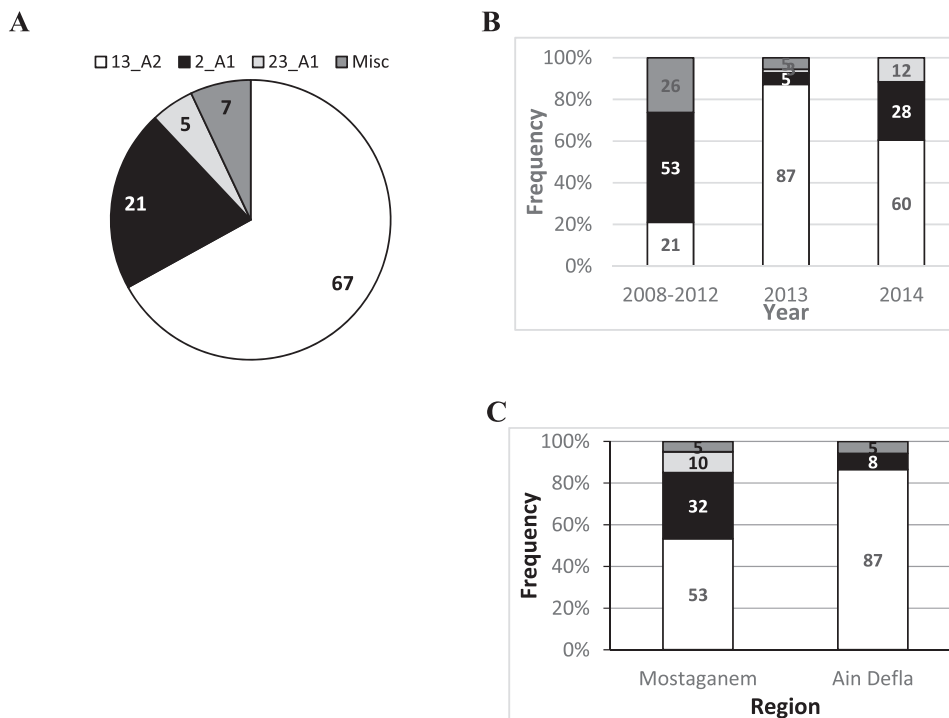
In this study, a total of 161 Algerian *Phytophthora infestans* isolates collected over the period of 2008–2014 were characterized both for phenotypic traits, such as mating type and metalaxyl sensitivity and genotypically, using SSR markers. The obtained results revealed important aspects of *P. infestans* population in northwestern Algeria over this period. An

analysis of mating types indicated a shift from the A1 to the A2 mating type of Algerian *P. infestans* isolates. Fungicide resistance testing indicated a high proportion of metalaxyl resistance over the years 2008–2014. Genotypic analysis with SSR markers revealed the spread of a dominant 13\_A2 clone, a lower frequency of two other clones and occasional infection by previously undescribed genotypes.

Potato and tomato production is important in Algeria but despite the damage caused by late blight there have been

**Table 2 – Allele frequencies and Gene diversity of SSR loci.**

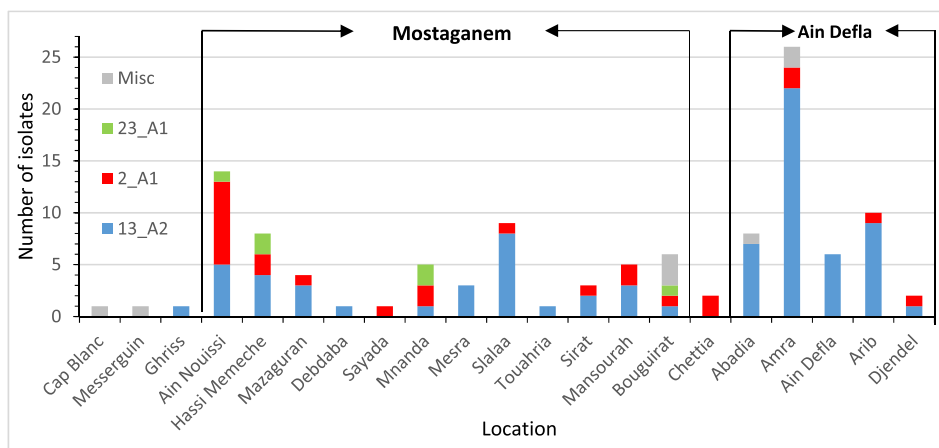
SSR Locus	Fragments	Alleles detected and allele frequencies (in parentheses)	Gene diversity (H)
Pi02	5	258 (0.103) 266 (0.310) 268 (0.517) 270 (0.051) 272 (0.017)	0.561
Pi4B	3	205 (0.285) 213 (0.393) 217 (0.321)	0.660
G11	12	142 (0.092) 152 (0.015) 154 (0.277) 156 (0.107) 158 (0.015) 160 (0.246) 162 (0.046) 164 (0.031) 168 (0.015) 206 (0.123) 208 (0.015) 210 (0.015)	0.823
Pi04	3	166 (0.423) 168 (0.077) 170 (0.500)	0.565
Pi63	3	270 (0.163) 273 (0.327) 279 (0.509)	0.607
Pi70	2	192 (0.839) 195 (0.161)	0.269
D13	9	136 (0.523) 138 (0.031) 140 (0.169) 144 (0.015) 152 (0.015) 154 (0.200) 158 (0.015) 206 (0.015) 210 (0.015)	0.655
SSR11	3	331 (0.074) 341 (0.796) 355 (0.129)	0.343
SSR2	2	173 (0.0911) 175 (0.089)	0.162
SSR4	9	284 (0.278) 288 (0.115) 290 (0.131) 292 (0.098) 294 (0.262) 296 (0.049) 298 (0.016) 300 (0.033) 302 (0.016)	0.809
SSR6	3	240 (0.259) 242 (0.167) 244 (0.574)	0.574
SSR8	3	260 (0.426) 264 (0.111) 266 (0.463)	0.592
Total	57		



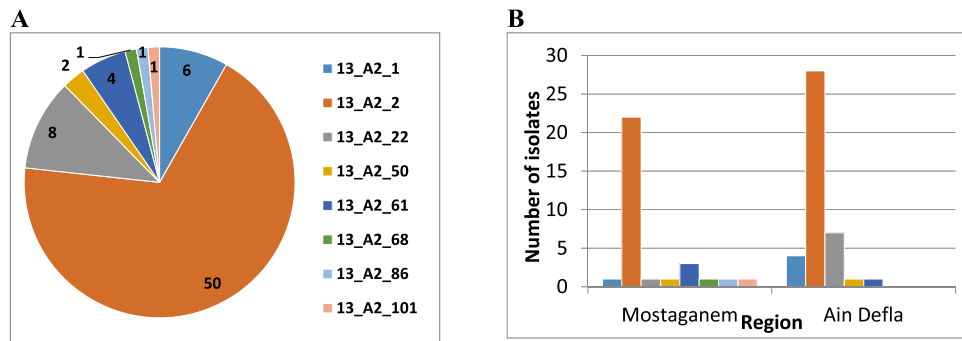
**Fig 4 – Genotype frequency of *Phytophthora infestans* isolates collected from the northwestern Algeria during 2008–2014. (A) For all isolates tested (n = 117). (B) With respect to sampling year. (C) With respect to two regions (Mostaganem and Ain Defla).**

few studies on the pathogen. Previous reports on relatively few isolates (Beninal et al. 2009; Corbière et al. 2010) documented the appearance of the A2 mating type as early as 2007. More detailed analysis of isolates collected from 2013 and 2014 crops in this study confirms the dominance of the A2 type in two important Algerian production areas. The importation of large quantities of infected potato tubers every year from European countries such as the Netherlands (accounting for more than 50 % of the total), Denmark, France and the UK where recent increases in the frequency of the A2 mating type have been reported (Montarry et al. 2008; Cooke et al. 2012; Li et al. 2012; Mariette et al. 2016) is a probable

cause of this increase. Similar results were reported in Morocco (Sedegui et al. 2000; Hammi et al. 2002). In contrast, a lower frequency of A2 mating type was reported in many countries, such as Tunisia (Hamada & Harbaoui 2010; Harbaoui et al. 2013), Italy (Savazzini & Galletti 2015) and China (Tian et al. 2015). The data on the 15 tomato isolates in this study showed that all except one were A1 mating type. This distinction between isolates of both hosts needs to be confirmed with a large number of tomato isolates. Many reports demonstrate that distinct clonal lineages of *P. infestans* are associated with potato and tomato within the same region (Legard et al. 1995; Oyartzun et al. 1998; Suassuna et al. 2004)



**Fig 5 – Frequency of *Phytophthora infestans* genotypes in the northwest of Algeria during 2008–2014 with respect to sampling sites (from West to East).**



**Fig 6 – Sub-groups frequency analysis of the genetic ‘13\_A2’ lineage of *Phytophthora infestans* isolates collected from north-western Algeria during the period of 2008–2014. (A) For all isolates identified as ‘13\_A2’ group (n = 73). (B) Depending on the region of sampling (Mostaganem and Ain Defla).**

but are in contrast with the monitoring results from India reported by Chowdappa et al. (2015), who found that the A2 population of genotype 13\_A2 was responsible for severe late blight outbreaks on potato and tomato in South India. The high frequency of A2 isolates on potato crop in most of sampling sites might be related to the emergence of ‘new’ more aggressive A2 isolates, introduced from Europe through imported potato tubers as has been reported previously. It was found that the frequencies of A1 and A2 isolates vary greatly between Ain Defla and Mostaganem, two emerging potato production regions in north-western Algeria. The high frequency of A2 isolates in Ain Defla may be interpreted as an adaptation of these isolates to potato crops present in the majority of the collection sites but which are far from tomato production areas. It is important to note that all tomato production sites surveyed in Ain Defla were free of late blight. In contrast, potato and tomato are grown in adjacent fields in the Mostaganem region. The closeness of the two mating type frequencies in this region may be explained by the spread and exchange of isolates between both crops. The coexistence of both mating types in most of the sampling sites means that sexual reproduction and the production of oospores (Turkensteen et al. 2000) may occur in this region. These sexual structures greatly contribute to the overwintering survival and to the nature of the population structure of *P. infestans* (Andersson et al. 1998; Lehtinen & Hannukkala 2004; Fry 2008).

In this study, a high level of metalaxyl resistance in the Algerian *P. infestans* population in every year (73 % from 2008 to 2012, 96 % in 2013 and 95 % in 2014) and in most sampling sites was observed (Fig 3). Similar results were reported in many studies worldwide (Gisi & Cohen 1996; Goodwin et al. 1998; Jmour & Hamada 2006; Harbaoui et al. 2013; Savazzini & Galletti 2015). In contrast low levels of resistance have been reported in Norway, Sweden, Finland, Denmark (Lehtinen et al. 2008), Poland (Chmielarz et al. 2014) and Latvia (Aav et al. 2015). In this study resistance to metalaxyl was observed in both regions, Ain Defla and Mostaganem, and with a higher proportion in the A2 mating type isolates. This relationship between metalaxyl resistance and A2 mating type was detected amongst 25 isolates collected in 2007 and 2008 in north-western Algeria (Corbière et al. 2010). Similar results were also reported in many regions of the world (Miller et al. 1997;

Goodwin et al. 1998; Hammi et al. 2002; Cooke et al. 2003; Fontem et al. 2005). The higher metalaxyl resistance observed in A2 mating type might be also associated with the occurrence of ‘new’ population of A2 isolates which are more tolerant to this fungicide as found in many regions in Europe (Cooke et al. 2012). In addition, the extensive use of metalaxyl in Algeria, especially since the severe late blight epidemics recorded during 2007–2008 (Corbière et al. 2010), has probably been another factor in the rapid increase of the resistant population. These results suggest that the use of metalaxyl to control late blight may not be a suitable management strategy in Algeria.

The genetic structure deduced from the microsatellite genotyping revealed a low genetic diversity among *P. infestans* population in north-western Algeria. The 13\_A2 clonal lineage was the predominant genotype, especially on potato crops, and it was found with several subclonal variants in multiple locations. The genetic diversity data are consistent with the introduction and spread of 13\_A2 into Algeria by means of infected potato tuber seed. *P. infestans* MLG 13\_A2 known as ‘Blue 13’ was first detected in the Netherlands and Germany in 2004 and is known to be resistant to metalaxyl (Cooke et al. 2012). Over the last decade the dominance of 13\_A2 strain was reported in several European countries (Cooke et al. 2010; Kildea et al. 2010; Mariette et al. 2016) and it has spread into Asia (Chowdappa et al. 2015). According to some authors (Lees et al. 2009; White & Shaw 2009; Cooke et al. 2012), this dominance is attributed to this genotype’s increased virulence and aggressiveness (Cooke et al. 2012; Chmielarz et al. 2014). Isolates of 13\_A2 were reported to be the most aggressive on five potato cultivars and were better suited to cooler (13 °C) than warmer (18 °C) conditions (Cooke et al. 2012). However, in southern India, where the average temperature varied from 20.8 °C to 22.5 °C, the European 13\_A2 lineage was also highly suited to local temperatures and was highly aggressive on potato and tomato (Chowdappa et al. 2013; Chowdappa et al. 2015). This is consistent with its adaptation to conditions in Algerian crops where the average temperature varied from 12 to 22 °C during the main cropping season. The dominance of 13\_A2 isolates in Algeria may be also associated with its adaptation to Spunta, dominant cultivar preferred by farmers for its short cycle and productivity. The study of few *P. infestans* isolates collected from the northwest of Algeria in 2008

showed significant aggressiveness of these isolates on cultivar Spunta (Corbière *et al.* 2010). In common with other studies (Cooke *et al.* 2012; Li *et al.* 2012), subclonal variation was observed in the 13\_A2 population in Algeria. The 13\_A2\_2 sub-type was most commonly recovered from 2008 to 2014 with other sub-types of this also found locally.

Isolates of the 2\_A1 lineage were also recovered on both tomato and potato hosts in this survey. This lineage has been present in Europe since at least 1982 (Cooke *et al.* 2012) also probably imported into Algeria with seed potato tubers in the past. The decline of 2\_A1 isolates over the period of this survey may be a sign of its displacement by the aggressive and metalaxyl resistant 13\_A2 clonal lineage. The third genotype detected among Algerian *P. infestans* population was 23\_A1. This lineage was present on both hosts but only in Mostaganem region and it was detected for the first time in 2013 on tomato and then in 2014 on potato crops. The 23\_A1 strain was dominant on tomato, but uncommon on potato during 2012 in Great Britain (Stroud *et al.* 2016). In contrast, it was present with a higher frequency on potato among *P. infestans* population in Egypt (El-Ganainy *et al.* 2013). The three clonal lineages identified in this current study were not recovered in the Tunisian population which comprised strains never reported in European countries (Harbaoui *et al.* 2014) or southern India (Chowdappa *et al.* 2015).

In this study, 8 'Misc' isolates were detected on both hosts from different sites. Six of them were of the A1 mating and two belonging to the A2 mating type. These Misc MLGs are interpreted as being evidence of the germination of sexually generated oospores in some regions of Europe (Sjöholm *et al.* 2013). As Misc isolates are collected from areas where both mating types are present, it is possible that these genotypes have generated through the sexual recombination of A1 and A2 mating types. Furthermore, in some prospected potato fields where furrow irrigation system is used, the first symptoms of late blight were observed on lower stems of plants, which probably caused by oospore-derived infection. However, as it is not confirmed whether oospores are formed in Algerian crops it is possible that these represent locally spread ephemeral seed-borne sources of inoculum that have not spread to be recognized as clonal lineages.

Finally, a high genotypic diversity level was observed in potato population collected from the Mostaganem region compared with Ain Defla region. More than three MLGs were sometimes detected in the same field in some potato production areas of Mostaganem region. This may be due to a larger population on a more diverse range of hosts in Mostaganem or the rare occurrence of the sexual reproduction in this region where both mating types were present in the majority of the collection sites. According to Goodwin *et al.* (1995), sexual recombination is currently contributing to the increase of the genetic composition of the pathogen. In fact, a high genetic diversity, reported in Nordic and Estonian *P. infestans* populations was attributed to the implication of sexual reproduction (Sjöholm *et al.* 2013; Runno-Paurson *et al.* 2016). The high level of genotypic diversity observed in Mostaganem region might be also related to its specific weather conditions which allow the cultivation of potato all year round, so several generations of the pathogen can occur, and this could implicate the appearance of new genotypes. In contrast, potato

population in Ain Defla region was composed mainly of the Blue 13 strain. It seems that this clonal lineage is well-adapted to the warm environmental conditions which characterize this region. The study realized by Shakya *et al.* (2015) of the effects of some climatic factors, such as temperature on *P. infestans*, showed response variability between different clonal lineages.

## Conclusion

In conclusion, the results presented in this study revealed that *Phytophthora infestans* population in northwestern Algeria is mainly composed of the A2 mating type isolates associated with the clonal lineage 13\_A2 and A1 isolates of 2\_A1 and 23\_A1. The high level of metalaxyl resistance in *P. infestans* population suggests that the use of metalaxyl formulations should be carefully planned in late blight management in Algeria.

This study is a preliminary contribution to the worldwide effort to characterize *P. infestans* and it provides some information on the pathogen populations in strategic regions of Algeria. Further investigations are required to establish a complete structure of the entire population of this pathogen, especially on tomato and thus complete the map of all the production areas. Moreover, by monitoring the distribution and evolution of *P. infestans*, it is possible to investigate and understand the evolution and epidemiology of late blight in Algeria, and thus improve the management strategies of this disease.

## Acknowledgements

This research was supported in principal by the University of Mostaganem, Algeria and a part of this work was funded by the Scottish Government. D. Andrivon and R. Corbière (INRA Rennes, France) are gratefully acknowledged for technical support on phenotypic characterization and supplying tester isolates for mating type determination. The collaboration of Mostaganem University with Catania University and The James Hutton Institute was appreciated. We thank F. Touati (CTS of Oran, Algeria) for assistance on the use of software. We are also grateful to M. Labdaoui and I. Bouazza (University of Mostaganem, Algeria) for their help with plants care and metalaxyl test.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2017.01.004>.

## REFERENCES

- Aav A, Skrabule I, Bimšteine G, Kaart T, Williams IH, Runno-Paurson I, 2015. The structure of mating type, metalaxyl resistance and virulence of *Phytophthora infestans* isolates collected from Latvia. *Zemdirbyste-Agriculture* 102: 335–342.

- Andersson B, Sandstrom M, Stromberg A, 1998. Indications of soil borne inoculum of *Phytophthora infestans*. *Potato Research* **41**: 305–310.
- Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME, 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* **36**: 181–186.
- Andrивon D, Pilet F, Montary J, Hafidi M, Corbière R, Achbani EH, Pellé R, Ellisèche D, 2007. Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. *Ecology and Epidemiology* **97**: 338–343.
- Beninal L, Corbière R, Kedad A, Andrивon D, Bouznad Z, 2009. A2 mating type, metalaxyl resistance and complex virulence profiles: common features in some *Phytophthora infestans* isolates from Algeria. In: *Proceedings of the Eleventh EuroBlight Workshop (October 28–31, 2008, Hamar, Norway)*, pp. 237–341. PPO-Special Report no. 13.
- Chmielarz M, Sobkowiak S, Debski K, Cooke DEL, Brurberg MB, Śliwka J, 2014. Diversity of *Phytophthora infestans* from Poland. *Plant Pathology* **63**: 203–211.
- Chowdappa P, Kumar NBJ, Madhura S, Kumar MSP, Myers KL, Fry WE, Squires JN, Cooke DEL, 2013. Severe outbreaks of late blight on potato and tomato in south India caused by recent changes in the *Phytophthora infestans* population. *Journal of Phytopathology* **161**: 49–58.
- Chowdappa P, Kumar NBJ, Madhura S, Kumar MSP, Myers KL, Fry WE, Cooke DEL, 2015. Severe outbreaks of late blight on potato and tomato in south India caused by recent changes in the *Phytophthora infestans* population. *Plant Pathology* **64**: 191–199.
- Cooke DEL, Young V, Birch PRJ, Toth R, Gourlay F, Day JP, Carnegie S, Duncan JM, 2003. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995–97). *Plant Pathology* **52**: 181–192.
- Cooke DEL, Lees AK, 2004. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathology* **53**: 692–704.
- Cooke DEL, Andersson B, Bakonyi J, Hansen JG, Lassen P, Lees A, 2010. Eucablight – pathogen database update. In: *Proceedings of Twelfth EuroBlight Workshop (3–6 May 2010, Arras, France)*, pp. 55–65. PPO-Special Report no. 14.
- Cooke DEL, Cano LM, Raffaele S, Bain RA, Cooke LR, Etherington GJ, Deahl KL, Farrer RA, Gilroy EM, Goss EM, Grünwald NJ, Hein I, MacLean D, McNicol JW, Randall E, Oliva RF, Pel MA, Shaw DS, Squires JN, Taylor MC, Vleeshouwers VGAA, Birch PRJ, Lees AK, Kamoun S, 2012. Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathogens* **8**: 1–14.
- Corbière R, Andrивon D, 2003. Preparation of a Simple Pea Medium for Culturing *Phytophthora infestans*. <http://www.eucablight.org/EucaBlight.asp>.
- Corbière R, Rekad FZ, Galfout A, Andrивon D, Bouznad Z, 2010. Phenotypic and genotypic characteristics of Algerian isolates of *Phytophthora infestans*. In: *Proceedings of Twelfth EuroBlight Workshop (3–6 May 2010, Arras, France)*, pp. 133–146. PPO-Special Report no. 14.
- Deahl KL, Inglis DA, DeMuth SP, 1993. Testing for resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* isolates from Northwestern Washington. *American Potato Journal* **70**: 779–795.
- El-Ganainy SM, Tohamy AMM, Awad MA, Squires JN, Cooke DE, 2013. The population dynamics of *Phytophthora infestans* in Egypt. In: *Proceedings of American Phytopathological Society (APS) Meeting (August 10–14, 2013, Austin, Texas, USA)*, vol. 103. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.3041.7688>.
- FAOSTAT, 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Agricultural Statistics. Available at: <http://faostat.fao.org/>. (Accessed on October 2016).
- Fontem DA, Olanyab OM, Tsopmbenga GR, Owona MAP, 2005. Pathogenicity and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* isolates obtained from garden huckleberry, potato and tomato in Cameroon. *Crop Protection* **24**: 449–456.
- Fry WE, Goodwin SB, Dyer AT, Matuzak JM, Drenth A, Tooley PW, Sujkowski LS, Koh YJ, Cohen BA, Spielman LJ, Deahl KL, Inglis DA, Sandlan KP, 1993. Historical and recent migration of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways and implication. *Plant Disease* **77**: 653–661.
- Fry WE, Goodwin SB, 1997. Resurgence of the Irish potato famine fungus. *Bioscience* **47**: 363–371.
- Fry W, 2008. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology* **9**: 385–402.
- Gisi U, Cohen Y, 1996. Resistance to phenylamide fungicides: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Phytopathology* **34**: 549–572.
- Goodwin SB, Smart CD, Sandroock RW, Deahl KL, Punja ZK, Fry WE, 1998. Genetic change within populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada during 1994 to 1996: role of migration and recombination. *Phytopathology* **88**: 939–949.
- Goodwin SB, Sujkowski LS, Dyer AT, Fry BA, Fry WE, 1995. Direct detection of gene flow and probable sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in northern North America. *Phytopathology* **85**: 473–479.
- Hamada W, Harbaoui K, 2010. Monitoring *Phytophthora infestans* epidemics on potato in Tunisia using genetics and molecular tools. In: *Book of Abstracts Oomycete Molecular Genetics Network Congress (6–8 June 2010, Toulouse, France)*, p. 100.
- Hammi A, Msatef Y, Bennani Aismaili AEL, Serrhini MN, 2002. Mating type, Metalaxyl Resistance and Aggressiveness of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Morocco. *Phytopathology* **150**: 289–291.
- Harbaoui K, Hamada W, Vleeshouwers VGAA, Khammassy N, Harrabi M, van der Lee TAJ, 2013. Characterisation of *Phytophthora infestans* isolates collected from potato and tomato crops in Tunisia during 2006–2008. *Potato Research* **56**: 11–29. <http://dx.doi.org/10.1007/s11540-012-9228-3>.
- Harbaoui K, Hamada W, Li Y, Vleeshouwers VGAA, van der Lee T, 2014. Increased difficulties to control late blight in Tunisia are caused by a genetically diverse *Phytophthora infestans* population next to the clonal lineage NA-01. *Plant Disease* **98**: 898–908.
- Hermansen A, Hannukkala A, Hafskjold Nærstad R, Brurberg MB, 2000. Variation in populations of *Phytophthora infestans* in Finland and Norway: mating type, metalaxyl resistance and virulence phenotype. *Plant Pathology* **49**: 11–22.
- Jmour W, Hamada W, 2006. First report of A2 mating type of *Phytophthora infestans* in Tunisia using molecular markers and some observations on its metalaxyl resistance. *Tunisian Journal of Plant Protection* **1**: 85–91.
- Kildea S, Cooke LR, Quinn L, Armstrong C, Little G, Hutton F, Dowley DJ, Griffin D, 2010. Dramatic changes within the Irish *Phytophthora infestans* population during the 2008–2009 seasons. In: *Proceedings of Twelfth EuroBlight Workshop (3–6 May 2010, Arras, France)*, pp. 147–150. PPO-Special Report no. 14.
- Lees AK, Cooke DEL, Stewart JA, Sullivan L, Williams NA, Carnegie SF, 2009. *Phytophthora infestans* population changes: implications. In: *Proceedings of the Eleventh EuroBlight Workshop (October 28–31, 2008, Hamar, Norway)*, pp. 55–60. PPO-Special Report no. 13.
- Lees AK, Stewart JA, Lynott JS, Carnegie SF, Campbell H, Roberts AMI, 2012. The effect of a dominant *Phytophthora infestans* genotype (13\_A2) in Great Britain on host resistance to foliar late blight in commercial potato cultivars. *Potato Research* **55**: 125–134.
- Legard DE, Lee TY, Fry WE, 1995. Pathogenic specialization in *Phytophthora infestans*: aggressiveness on tomato. *Phytopathology* **85**: 1362–1367.

- Lehtinen A, Hannukkala A, 2004. Oospores of *Phytophthora infestans* in soil provide an important new source of primary inoculum in Finland. *Agricultural and Food Science* **13**: 399–410.
- Lehtinen A, Hannukkala A, Andersson B, Hermansen A, Le VH, Naerstad R, Brurberg MB, Nielsen BJ, Hansen JG, Yuen J, 2008. Phenotypic variation in Nordic populations of *Phytophthora infestans* in 2003. *Plant Pathology* **57**: 227–234.
- Li Y, van der Lee TAJ, Evenhuis A, van den Bosch GBM, van Bekkum PJ, Förch MG, van Gent-Pelzer MPE, van Raaij HMG, Jacobsen E, Huang SW, Govers F, Vleeshouwers VGAA, Kessel GJT, 2012. Population dynamics of *Phytophthora infestans* in the Netherlands reveals expansion and spread of dominant clonal lineages and virulence in sexual offspring. *Genes Genomes Genet* **2**: 1529–1540.
- Li Y, van der Lee T, Zhu JH, Jin GH, Lan CZ, Zhu SX, Zhang RF, Liu BW, Zhao ZJ, Kessel G, Huang SW, Jacobsen E, 2013. Population structure of *Phytophthora infestans* in China – geographic clusters and presence of the EU genotype Blue\_13. *Plant Pathology* **62**: 932–942.
- Mariette N, Mabon R, Corbière R, Boulard F, Glais I, Marquer B, Pasco C, Montarry J, Andrivon D, 2016. Phenotypic and genotypic changes in French populations of *Phytophthora infestans*: are invasive clones the most aggressive? *Plant Pathology* **65**: 577–586.
- Miller JS, Hamm PB, Johnson DA, 1997. Characterization of the *Phytophthora infestans* population in the Columbia Basin of Oregon and Washington from 1992 to 1995. *Phytopathology* **87**: 656–660.
- Montarry J, Glais I, Corbière R, Andrivon D, 2008. Adaptation to the most abundant host genotype in an agricultural plant-pathogen system—potato late blight. *Evolutionary Biology* **21**: 1397–1407.
- Oyarzun PJ, Pozo A, Ordoñez ME, Doucett K, Forbes GA, 1998. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. *Phytopathology* **88**: 265–271.
- Runno-Paurson E, Kiiker R, Joutsjoki T, Hannukkala A, 2016. High genotypic diversity found among population of *Phytophthora infestans* collected in Estonia. *Fungal Biology* **120**: 385–392. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2015.11.008>.
- Savazzini F, Galletti S, 2015. Phenotypic and genotypic characterization of Italian *Phytophthora infestans* isolates. *Phytopathologia Mediterranea* **54**: 524–530.
- Sedegui M, Carroll RBAL, Morehart AL, Evans TA, Kim SH, Lakhdar R, Arifi A, 2000. Genetic structure of the *Phytophthora infestans* population in Morocco. *Plant Disease* **84**: 173–176.
- Shakya SK, Goss EM, Dufault NS, van Bruggen AH, 2015. Potential effects of diurnal temperature oscillations on potato late blight with special reference to climatic change. *Phytopathology* **105**: 230–238.
- Sjöholm L, Andersson B, Högberg N, Widmark A-K, Yuen J, 2013. Genotypic diversity and migration patterns of *Phytophthora infestans* in the Nordic countries. *Fungal Biology* **117**: 722–730.
- Stroud JA, Shaw DS, Hale MD, Steele KA, 2016. SSR assessment of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in British gardens demonstrates high diversity but no evidence for host specialization. *Plant Pathology* **65**: 334–341.
- Suassuna ND, Maffia LA, Mizubuti ESG, 2004. Aggressiveness and host specificity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* **53**: 405–413.
- Tian Y, Sun J, Li H, Wang G, Ma Y, Liu D, Quan J, Shan W, 2015. Dominance of a single clonal lineage in the *Phytophthora infestans* population from northern Shaanxi, China revealed by genetic and phenotypic diversity analysis. *Plant Pathology* **64**: 200–206.
- Turkensteen LJ, Flier WG, Wanningen R, Mulder A, 2000. Production, survival and infectivity of oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* **49**: 688–696.
- White S, Shaw D, 2009. Resistance of sarpo clones to the new strain of *Phytophthora infestans*, Blue-13. In: *Proceedings of the Eleventh EuroBlight Workshop (October 28–31, 2008, Hamar, Norway)*, pp. 61–69. PPO-Special Report no. 13.

# Structure of *Phytophthora infestans* population in north-western Algeria from 2008-2014

F. Z. Rekad<sup>1\*</sup>, D. E. L. Cooke<sup>2</sup>, S. O. Cacciola<sup>3</sup>, I. Puglisi<sup>3</sup>, E. Randall<sup>2</sup>, M. Evoli<sup>3</sup>, Y. Guenaoui<sup>1</sup>, Z. Bouznad<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Département d'Agronomie, Faculté SNV, Université Abdelhamid Ibn Badis— Site 3-EX ITA- 27000 Mostaganem, Algeria <sup>2</sup>The James Hutton Institute, Invergowrie, Dundee, United Kingdom  
<sup>3</sup>Dipartimento di Agricoltura Alimentazione e Ambiente, Università degli Studi di Catania, Italy <sup>4</sup>Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) – 16200 El Harrach, Algiers, Algeria.  
 \*E-mail: fatifz2001@yahoo.fr

## INTRODUCTION

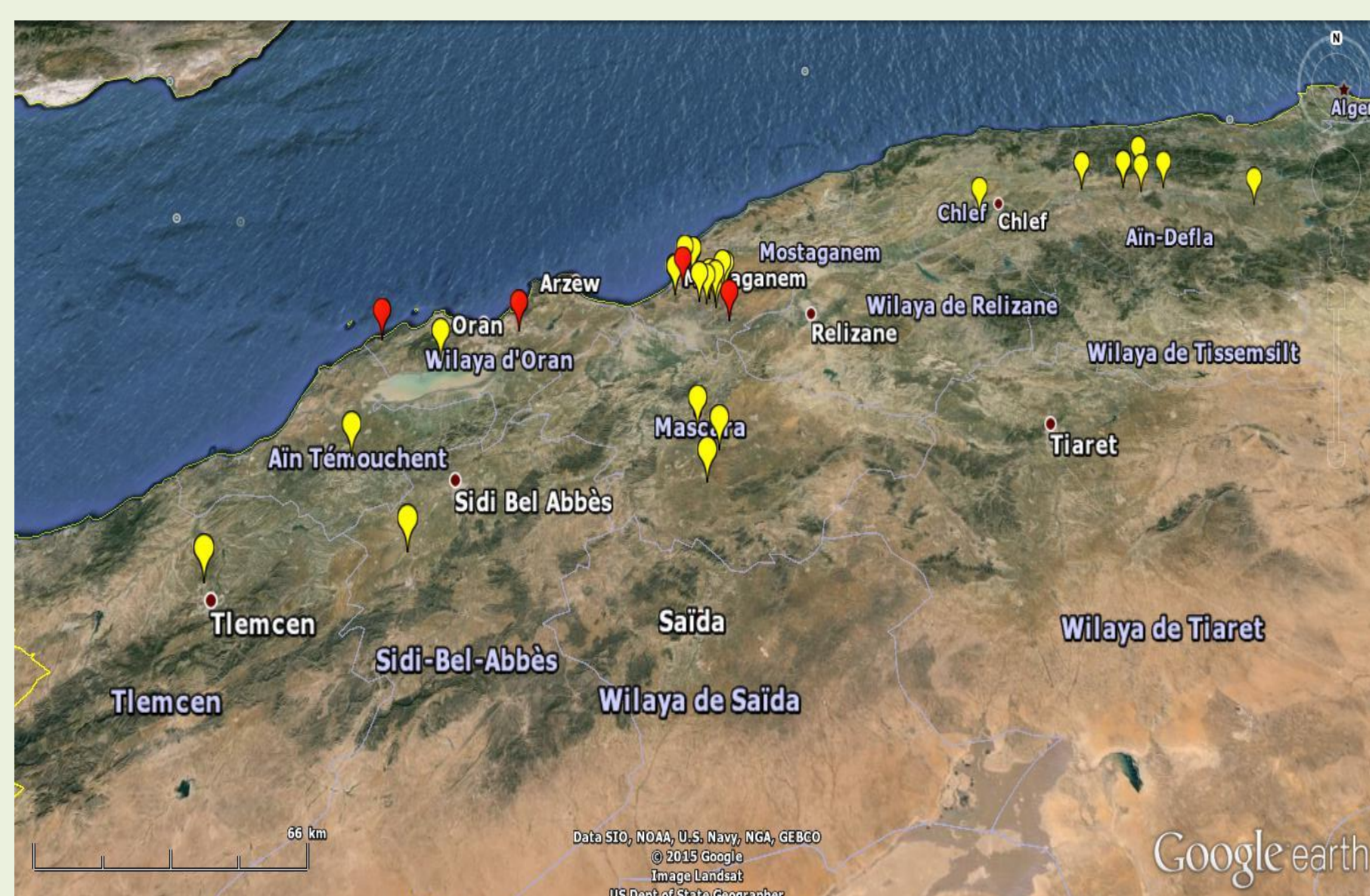
Late blight caused by *Phytophthora infestans* is the most serious disease of potato worldwide. In Algeria the disease is very common on potato, but has also been reported on tomato in some areas of the country.

During 2008-2014, the late blight has reached epidemic proportions in many potato-growing areas of the north west of Algeria, an emerging potato production region. Consequently, heavy yield losses were recorded despite the excessive use of fungicide.

In order to understand the population of pathogen in north west Algeria, a total of 161 *P. infestans* isolates collected on potato and tomato from 2008-2014 were characterized for the mating type, the level of metalaxyl sensitivity (n=92) and their genotypic diversity with microsatellite markers (n=117).

## MATERIALS AND METHODS

Samples were collected during 2008-2014 from potato crops grown in the field and tomatoes grown in the field and greenhouses, located in different sites in north west Algeria (Fig. 1).

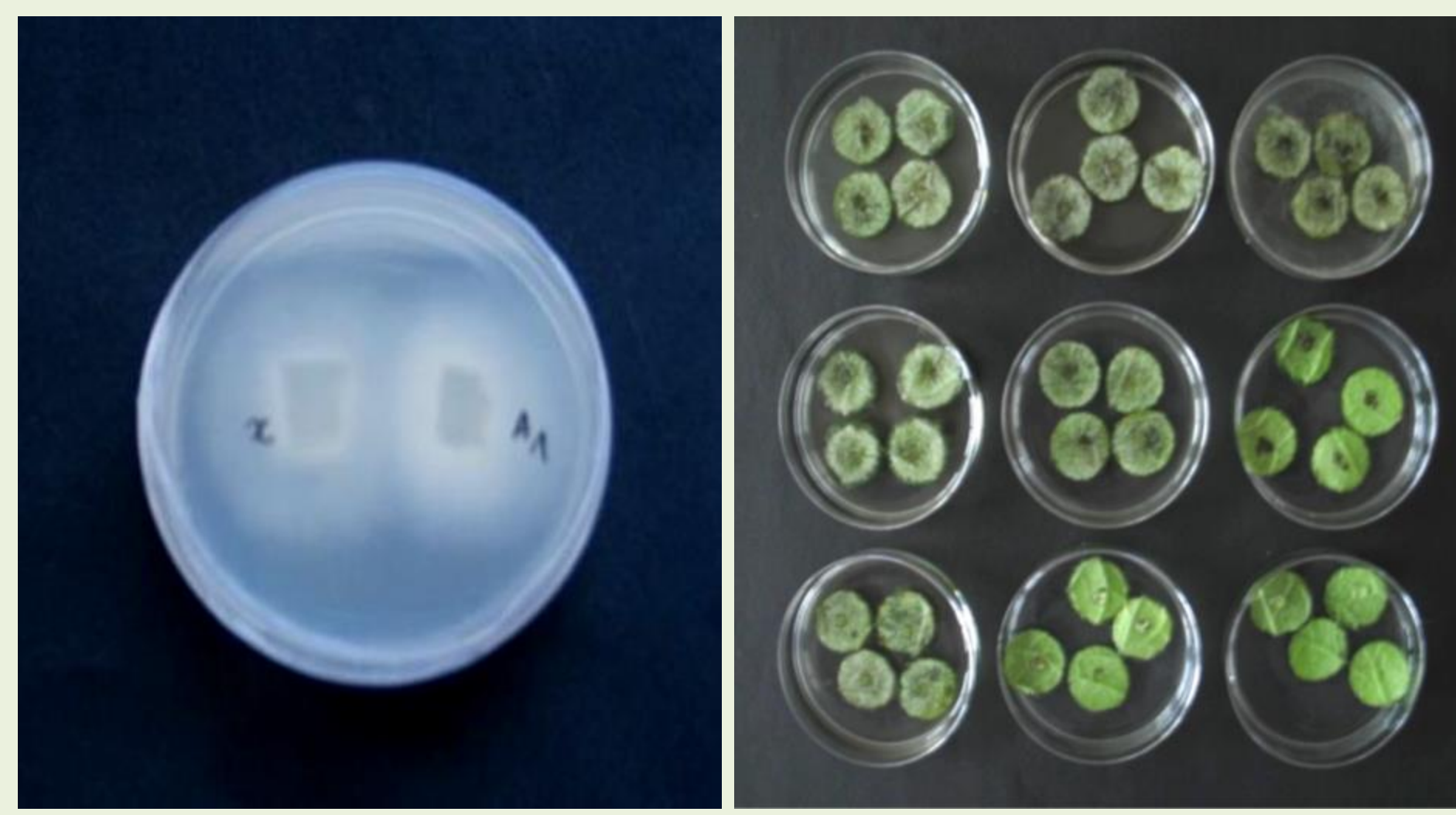


**Figure 1:** The Survey map indicating locations where tested isolates were taken during 2008 to 2014 in north-west Algeria

- The **mating type** of the isolates was determined by pairing them with reference isolates of A1 and A2 mating type on pea medium. After 11-15 days of incubation at 15°C, plates were examined microscopically for the presence of the oospores in the hyphal interaction area between the isolates paired.

- The **sensitivity to metalaxyl** was determined by the isolates' ability to grow and sporulate on potato leaf discs at different concentrations (0, 10, 100 mg/L). Isolates sporulating on the discs floating on water containing 100 mg/L metalaxyl were rated as resistant (R), those on 10 mg/L were rated as intermediate (I) and those that sporulated only on water were considered as sensitive (S).

- The **genotypic diversity** was analyzed using simple sequence repeats (SSR) markers: Pi02, Pi4B, G11, Pi04, Pi63, Pi70, D13, SSR2, SSR4, SSR6, SSR8 and SSR11.



**Figure 2:** Mating type test **Figure 3:** Metalaxyl sensitivity test

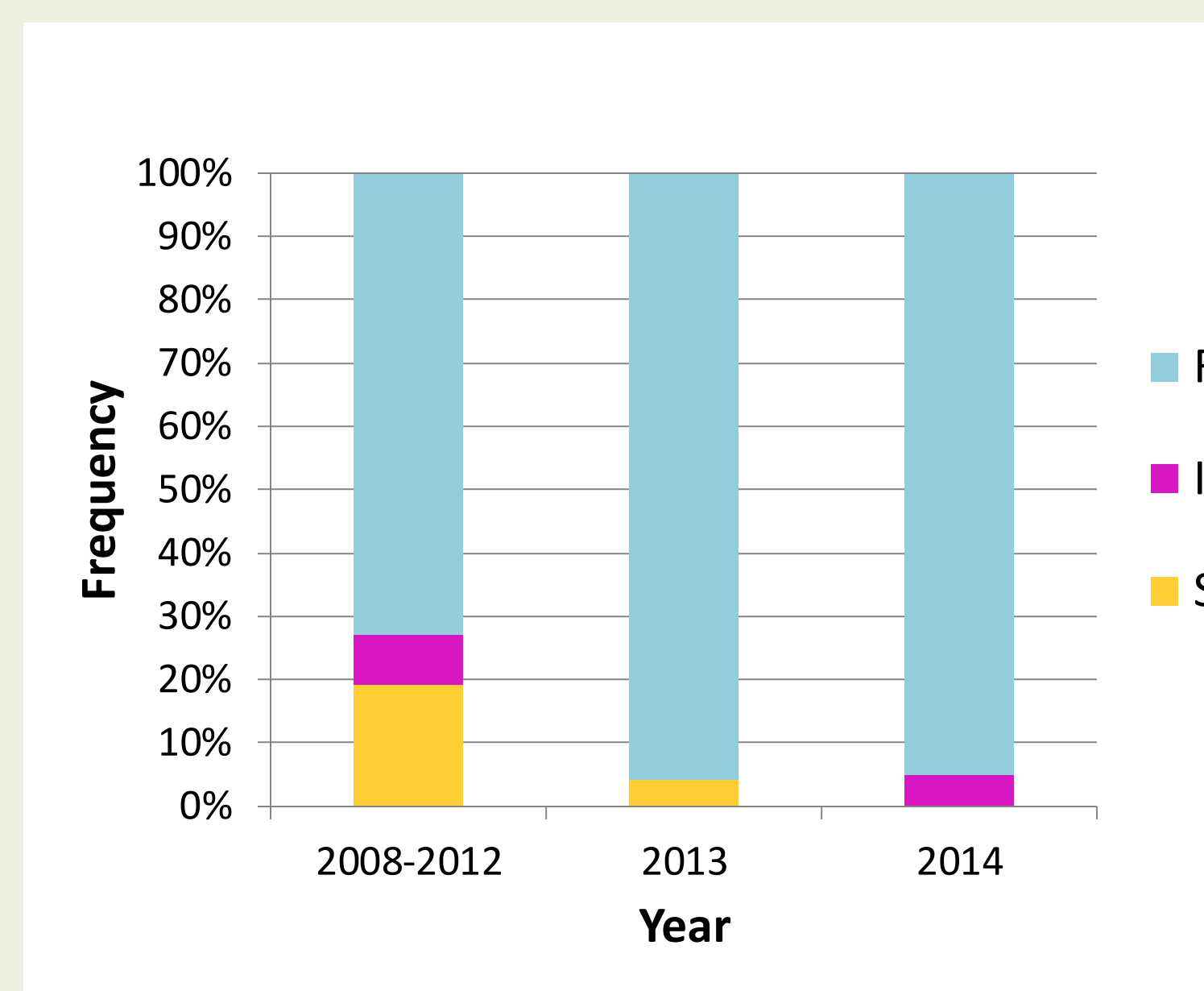
## RESULTS

- A mating type assay showed that 70 % isolates were A2 mating type and 30 % were A1 mating type. Both mating types were sometimes found in the same field.

- A high percentage of resistance to metalaxyl (89%) among isolates was detected. Metalaxyl resistant phenotype was present in both mating types with a higher percentage among A2 mating type isolates.



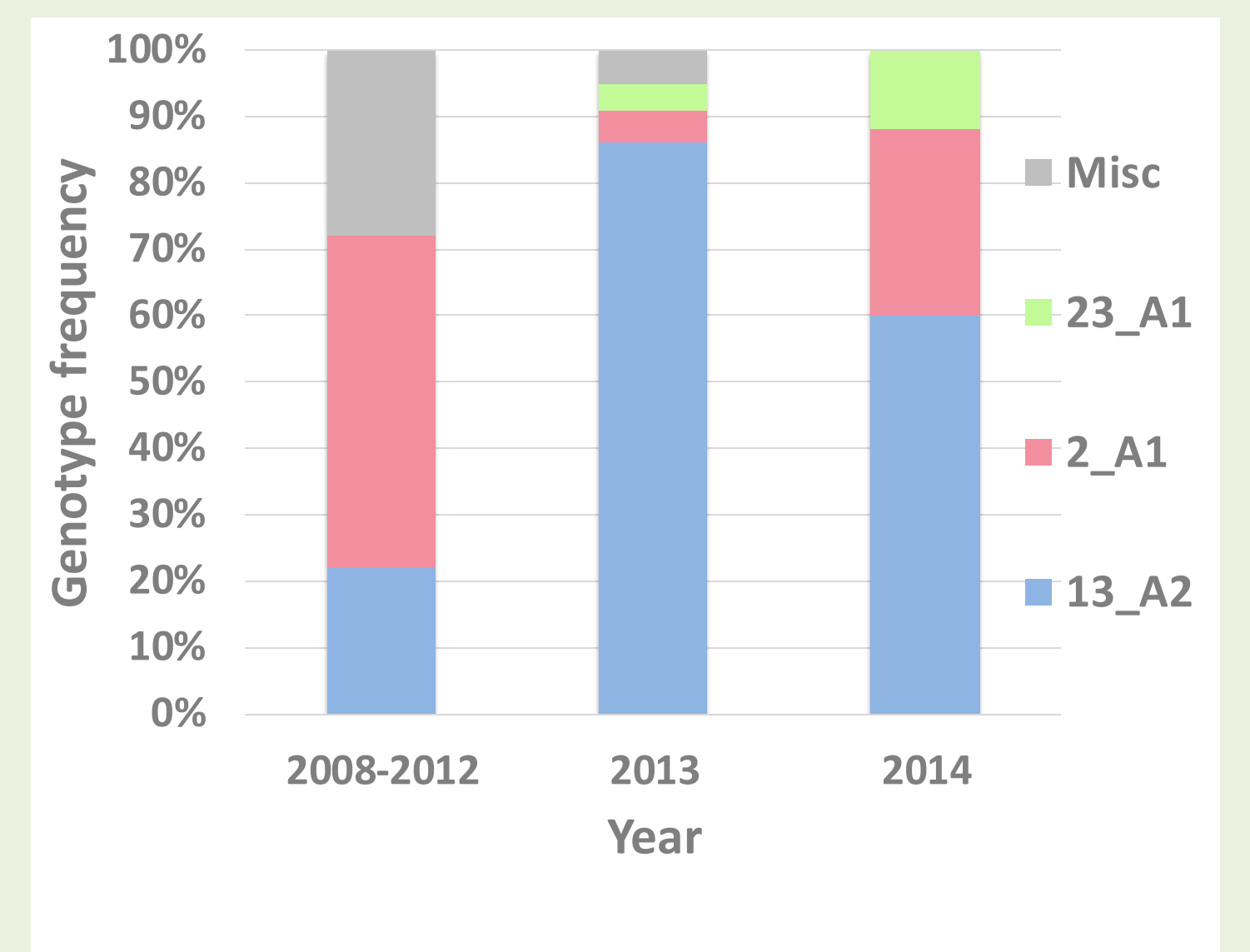
**Figure 4:** Frequency of mating types (A1, A2) among *Phytophthora infestans* isolates from north-western Algeria during 2008-2014



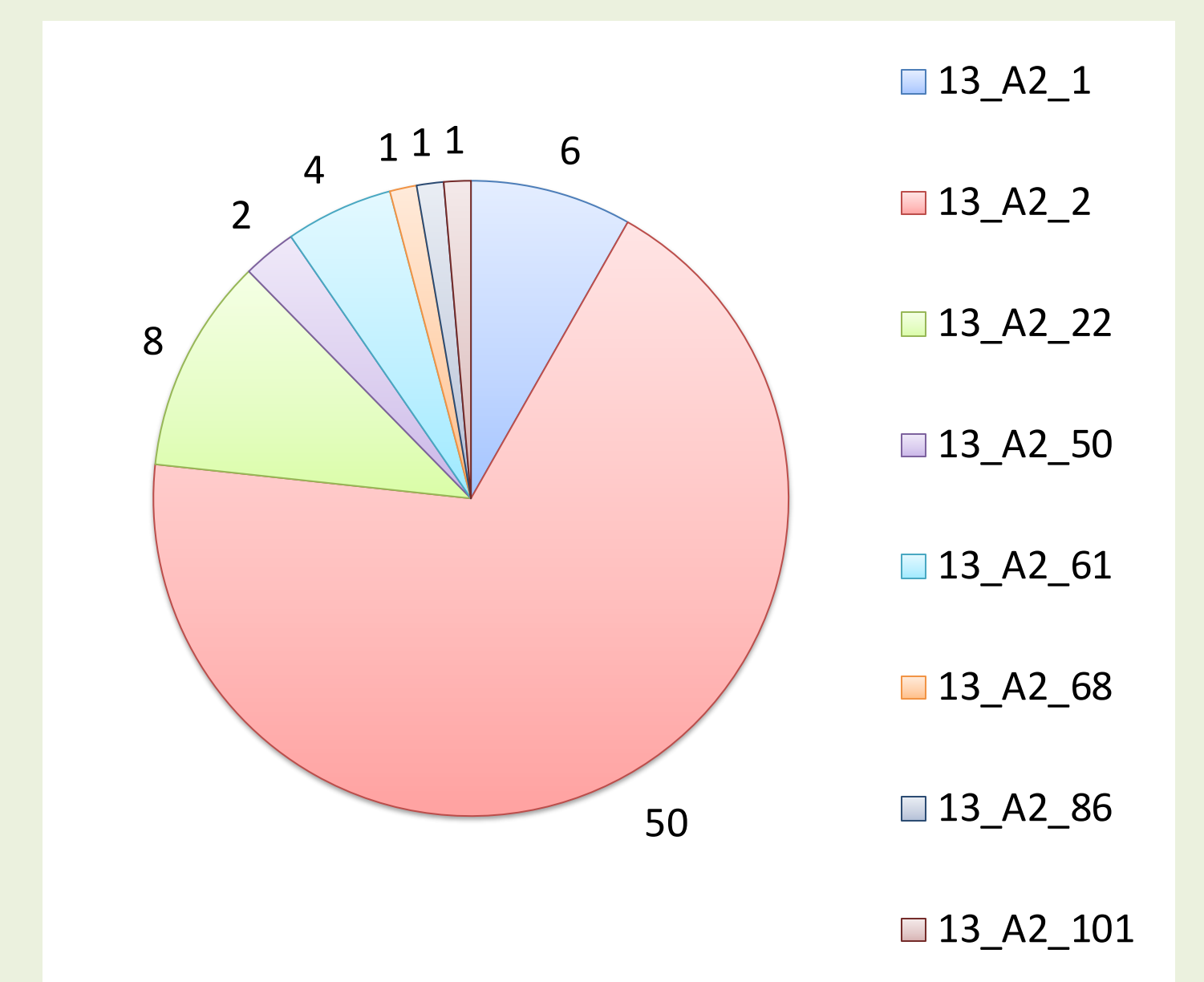
**Figure 5:** Metalaxyl resistance among *Phytophthora infestans* isolates from the northwestern Algeria during 2008-2014

- SSR analysis of *P. infestans* population showed a low genotypic diversity. Genotype 13\_A2 was the predominant in the population with a frequency of 67% followed by 2\_A1 (21%) and 23\_A1 (5%). Genotype 23\_A1 was detected only in tomato and potato isolates collected in 2013 and 2014.

- Several sub-clonal variants were observed in the 13\_A2 population in Algeria. The 13\_A2\_2 subtype was most commonly recovered from 2008 to 2014.



**Figure 6:** Genotype frequency of *Phytophthora infestans* isolates collected from north-western Algeria during 2008-2014.



**Figure 7:** Sub-groups frequency analysis of the genetic 13\_A2 lineage of *Phytophthora infestans* isolates collected from north-western Algeria during the period of 2008 to 2014

## CONCLUSIONS

- Phytophthora infestans* population in north-western Algeria is mainly composed of the A2 mating type isolates associated with the clonal lineage 13\_A2 and A1 isolates of 2\_A1 and 23\_A1.

- The coexistence of both mating types in most of the sampling sites means that sexual reproduction and the production of oospores may occur in this region.

- The high level of metalaxyl resistance in *P. infestans* population suggests that the use of metalaxyl formulations should be carefully planned in late blight management in Algeria.

This study is a preliminary contribution to the worldwide effort to characterize *P. infestans* and it provides some information on the pathogen population in strategic region of Algeria. Further investigations are required to establish a complete structure of the entire population of this pathogen, especially on tomato and thus complete the map of all the production areas.

16th Euroblight Workshop – A potato late blight network for Europe – Aarhus, Denmark 14-17 May 2017



## **Annexe 1**

### **CULTURE EN SERRE DES VARIETES**

Préalablement à la plantation, les tubercules sont placés à température ambiante pendant une semaine pour avoir des germes d'environ 5mm. Des pots de 2L et 14cm de diamètre sont utilisés pour la plantation. Ils sont remplis de terreau composé d'1/3 de sable, 1/3 de limon et d'1/3 de tourbe. Le terreau est humidifié avant la plantation des tubercules (un tubercule et par pot) et des plantules de tomate (un plan par pot). La culture est réalisée sous serre. Les plantes sont arrosées régulièrement, sans excès d'humidité. Chaque semaine, une solution nutritive à base de NPK est apportée aux plantes. Cette solution est composée de 15% d'azote (N), 15% d'anhydride phosphorique ( $P_2O_5$ ) et 15% d'oxyde de potassium ( $K_2O$ ) à une concentration de 2g/L. Au fur et à mesure de leur croissance, les plantes sont tuteurées et les tiges sont attachées régulièrement. En culture, aucun traitement fongicide ni insecticide n'est réalisé car les plantes servent à des tests sur le mildiou.

## Annexe 2

### PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE PETITS POIS ET POIS CHICHE

#### Matériel

- Hotte à flux laminaire
- Bec Bunsen
- Casserole
- Couvercle
- Erlenmeyer
- Entonnoir
- Passoire à gros tamis
- Gants
- Coton
- Papier d'aluminium

#### Pour 1 Litre de milieu petits pois :

Petits pois congelés	125g
Eau distillée	1,2 L
Agar Agar	15g

Pour préparer un litre de milieu petits pois, le protocole expérimental est le suivant :

- Dans une casserole, introduire 125g de petits pois congelés dans un litre d'eau permutée. Rajouter 200 mL d'eau permutée à cause de l'évaporation.
- Mettre le couvercle sur la casserole et porter la préparation à ébullition puis laisser mijoter pendant 30 minutes.
- Pendant ce temps, introduire dans un erlenmeyer 15g d'Agar par litre de milieu, qui confèrent la texture solide au milieu.
- A fin de la cuisson, transvaser le jus de cuisson dans l'erlenmeyer à l'aide d'un entonnoir en filtrant les petits pois à travers une passoire à gros tamis posée sur le flacon (puis jeter les petits pois). Se munir de gants de protection contre les éventuelles brûlures.

## **Annexes**

- Boucher l'erenmeyer avec du coton et recouvrir de papier d'aluminium. Stériliser à l'autoclave à 120°C, pendant 20 minutes. Puis laisser refroidir en agitant régulièrement, afin d'éviter la solidification du milieu dans l'erenmeyer.
- Couler le milieu petits pois dans les boites de Petri sous hotte à flux laminaire, près d'un bec Bunsen afin d'éviter les contaminations. Laisser le milieu solidifier sous la hotte pendant une journée.
- Conserver les boîtes à température ambiante.

### **Pour 1 L de milieu Pois chiche**

Pois chiche	200 g
Glucose	20 g
Agar Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

Le pois chiche est trempé dans l'eau distillée pendant une nuit puis cuit dans de l'eau distillée. Après cuisson, le filtrat est récupéré, ajusté à 1000 ml. Le milieu est stérilisé à l'autoclave à 120°C, pendant 20 minutes.

## **Annexe 3**

### **PREPARATION DU MILIEU D'EAU GELOSEE A 1%**

#### **Matériel**

- Hotte à flux laminaire
- Bec Bunsen

Pour 1Litre de milieu eau gélosée à 1%

- 10g d'Agar
- 1L d'eau distillée
- Erlenmeyer
- Coton
- Papier d'aluminium

#### **Protocole**

Pour préparer un litre de milieu eau gélosée à 1%, le protocole expérimental est le suivant :

- Introduire dans un erlenmeyer 10g d'agar par litre de milieu, préalablement pesés à la balance de précision, qui confèrent la texture solide au milieu.
- Ajouter 1L d'eau distillée dans l'erlenmeyer. Agiter pour mettre l'Agar en solution.
- Boucher l'erlenmeyer avec du coton et recouvrir de papier d'aluminium. Stériliser à l'autoclave à 120°C, pendant 20 minutes. Puis laisser refroidir en agitant régulièrement, afin d'éviter la solidification du milieu dans l'erlenmeyer.
- Couler le milieu eau gélosée à 1% dans les boîtes de Petri sous hotte à flux laminaire, près d'un bec Bunsen afin d'éviter les contaminations. Laisser le milieu solidifier sous la hotte pendant une journée.
- Conserver les boîtes à température ambiante.

## **Annexe 4**

### **ISOLEMENTS DE *PHYTOPHTHORA INFESTANS*, A PARTIR DE NECROSE FOLIAIRE OU DE TIGE MALADE**

#### **Matériel**

- Etuve
- Tubercules de Spunta
- Papier filtre
- Boîte de Petri vierge
- Boîte de Pétri contenant du milieu de culture petits pois et des antibiotiques (ampicilline 200mg/L ; rifamycine 30mg/L ; pimaricine 0,4 mL/L)
- Eponge humide
- Scalpel

#### **Protocole**

Les isolements sont réalisés sur tubercules de pomme de terre d'une variété sensible, par exemple Spunta.

- Couper des tubercules, préalablement lavés et désinfectés (ou pelés), en tranches épaisses, puis les recouvrir de papier filtre pour absorber l'humidité.
- Placer ces rondelles dans des boîtes en plastiques hermétiques, sur un tampon éponge humidifié.
- Prélever de petits fragments de tissus malades, à la lisière de la nécrose, avec un scalpel stérile.
- Déposer 2 fragments sur chaque rondelle, un à chaque extrémité (face sporulante de la nécrose au contact du tubercule).
- Bien fermer les boîtes et mettre à incuber à 15°C, pendant environ 5 jours.
- Dès qu'un amas de mycélium s'est formé, le prélever stérilement, en évitant de toucher le tubercule et le déposer sur milieu solide petits pois contenant des antibiotiques (ampicilline 200mg/L ; rifamycine 30mg/L ; pimaricine 0,4 mL/L).
- Mettre à incuber à 15-18°C.
- Lorsque les colonies ont un peu poussé, les repiquer à nouveau sur milieu.

## **Annexe 5**

### **REPIQUAGE DES SOUCHES DE *PHYTOPHTHORA INFESTANS***

Le repiquage des souches concerne les isolats âgés d'au moins 6 semaines et tout isolat contaminé par un champignon (exemple : *Penicillium spp.*, *Cladosporium spp.*) ou une bactérie.

#### **Matériel**

- Hotte à flux laminaire
- Bec Bunsen
- Boîte de Petri portant l'isolat à repiquer (âgé ou contaminé)
- Boîte de Petri contenant du milieu petits pois
- Scalpel
- Marqueur indélébile
- Paraffine

#### **Protocole**

Le repiquage des isolats se fait en conditions stériles, sous la hotte à flux laminaire et près du bec Bunsen. Le protocole est le suivant :

- Sur le couvercle de chaque boîte de Petri, inscrire au marqueur le nom de l'isolat à repiquer
- A l'aide d'un scalpel stérilisé, prélever un morceau de gélose (1cm x 1cm) recouvert de mycélium à la périphérie de la boîte à repiquer. S'il s'agit d'une boîte contaminée, effectuer le prélèvement à l'opposé de la zone contaminée.
- Déposer l'explant au centre de la nouvelle boîte en veillant à retourner la gélose pour que le mycélium entre en contact avec le milieu petits pois.
- Après chaque prélèvement, stériliser le scalpel à l'alcool puis à la flamme, afin d'éviter les contaminations. Attendre que le scalpel ait refroidi pour procéder au repiquage suivant.
- Fermer chaque boîte de Petri avec un morceau de parafilm pour limiter le risque de contamination. Conserver les boîtes à l'obscurité dans une étuve à 15°C.

## **Annexe 6**

### **DETERMINATION DU TYPE SEXUEL : TEST DE CONFONTATION**

#### **Matériel**

- hotte à flux laminaire
- bec Bunsen
- scalpel
- alcool
- boîtes de Petri contenant du milieu petits pois
- isolat de type sexuel inconnu
- 2 isolats de référence : un de type sexuel A1, l'autre de type sexuel A2

#### **Protocole**

- Prélever un explant de l'isolat de type sexuel inconnu et le placer dans la boîte de Petri contenant du milieu petit pois, de telle sorte que le mycélium soit en contact avec le milieu petits pois.
- Prélever un explant de la souche de référence (A1 ou A2) et le déposer de la même manière dans la même boîte, à 1,5cm de l'explant précédent.
- Répéter la manipulation pour la seconde souche de référence, de manière à avoir 2 boîtes de confrontation.
- Mettre à incuber les deux boîtes dans une étuve obscure à 15°C pendant 10 à 15 jours.
- Observer à la loupe binoculaire les boîtes de Petri retournées, les oospores se développant sur le fond de la boîte.

2 cas possibles :

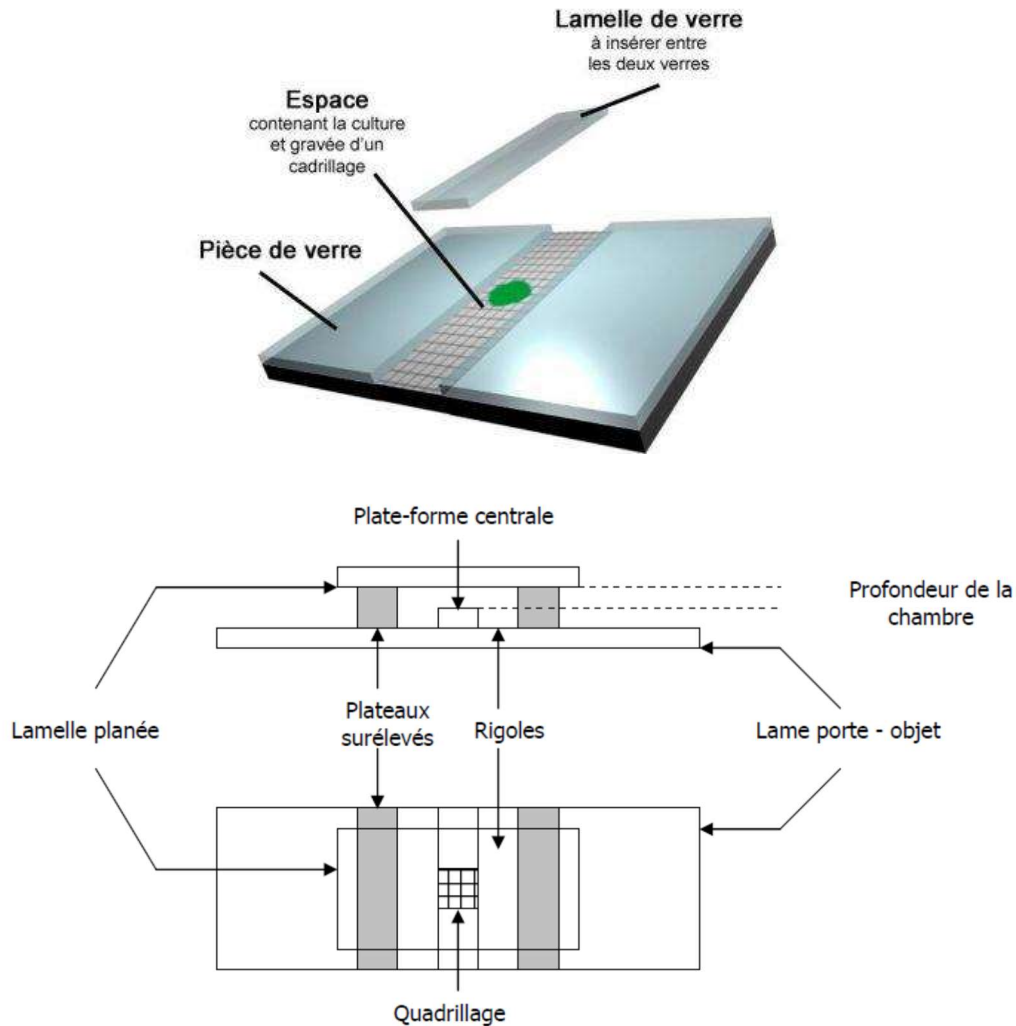
- Présence d'oospores avec la souche de référence A1 => la souche inconnue est A2
- Présence d'oospores avec la souche de référence A2 => la souche inconnue est A1

## Annexe 7

### Présentation de la cellule de Malassez

Utilisé pour le comptage de cellules (animales, végétales, fongiques) en suspension dans un liquide, la cellule de Malassez est une épaisse lame de verre creusée de rigoles qui délimitent des plates-formes :

- 2 plates-formes latérales surélevées qui supportent une lamelle en verre, épaisse et plane
- 1 plate-forme centrale légèrement abaissée sur laquelle est gravé un quadrillage.

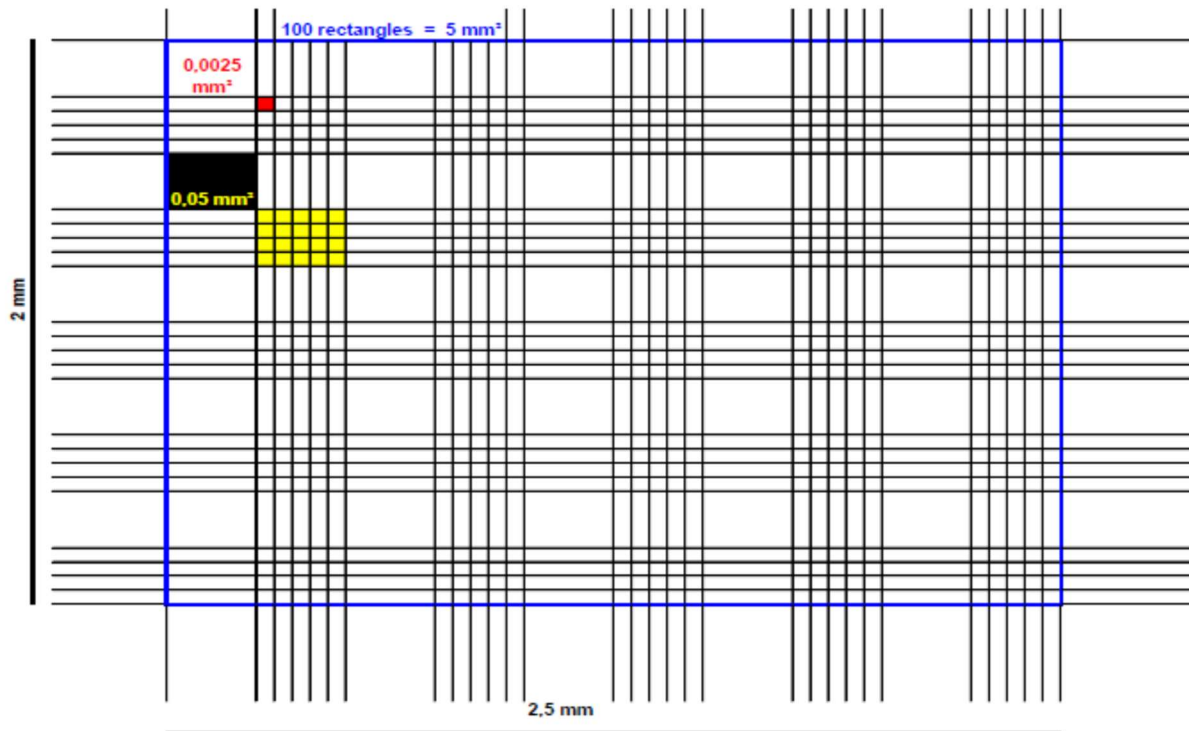


**Le volume de comptage est déterminé par :**

- la surface du quadrillage gravé sur la lame
- la profondeur de la chambre (0,200 mm)

## Annexes

Les deux zones quadrillées comportent chacune 100 rectangles :



Parmi ces 100 rectangles, 25 sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

- Le volume correspondant au quadrillage total est égal à **1 mm<sup>3</sup> = 1 µl = 10<sup>3</sup> ml**.
- Chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, Soit **0,01 mm<sup>3</sup> = 10<sup>5</sup> ml**.

### Dilution préalable de la suspension

Lorsque la suspension est trop concentrée, il est difficile de compter les spores sur la cellule de Malassez. Il est donc nécessaire de réaliser une dilution préalable.

### Remplissage de la cellule

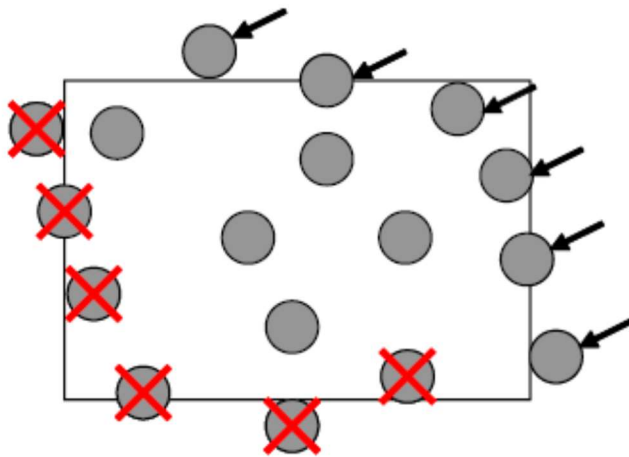
- Humectation les deux plateaux latéraux.
- Adhésion de la lamelle aux plateaux latéraux
- Homogénéisation de la suspension cellulaire, et prélèvement de 17 µl de cette suspension à l'aide d'une micropipette.
- Remplissage de chacune des deux chambres de comptage par capillarité en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate-forme centrale quadrillée.
- Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles.
- Après utilisation, la lame porte-objet et la lamelle planée sont rincées avec de l'eau distillée et essuyées avec du papier (sans frotter, en particulier au niveau du quadrillage).

## Annexes

### Comptage des spores

- Observation à l'objectif **X10** pour repérer la position du quadrillage, et vérification de l'homogénéité de la répartition des spores à compter.
- Réalisation du comptage à l'objectif **X10** dans 5 rectangles ou carrés selon une ligne diagonale de quadrillage.

Remarque : pour les spores chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules touchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).



Exemple : numération sur le rectangle = 11 spores

- Le dénombrement doit être réalisé sur les deux zones de quadrillage de la cellule.

### Calcul de la concentration

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration  $C$  de la suspension.

$$C = N / V \text{ Si la suspension avait été diluée : } C = (N / V) \times f$$

avec :

- $N$  : nombre total de spores comptées
- $V$  : volume total de comptage (en ml)
- $f$  : facteur de dilution
- $C$  : concentration de la suspension en nombre de spores par ml

En pratique, si le comptage a été réalisé sur  $n$  rectangles, la concentration  $C$  est égale à :

$$C = (N / n) \times 10^5 \text{ spores / ml, avec } n = \text{nombre de rectangles dénombrés}$$

$$\text{Si la suspension avait été diluée : } (N / n) \times f \times 10^5 \text{ spores / ml}$$

## **Annexe 8**

### **Isolats de *Phytophthora infestans* utilisés dans la présente étude**

**1** : isolats utilisés pour le test de l'effet de milieu de culture et de la lumière et l'obscurité ;

**2** : isolats utilisés pour le test de l'effet de la température ;

**3** : isolats utilisés pour le test d'agressivité.

<b>Isolats</b>	<b>Test</b>	<b>Année de prélèvement</b>	<b>Lien de prélèvement</b>	<b>Hôte</b>	<b>Variété</b>	<b>Type sexuel</b>
SBA		2008	Sidi Belabbes	Pomme de terre	Spunta	A2
ACT	2	2008	Ain Temouchent	Pomme de terre	Spunta	A2
SABL		2008	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
ABD	2	2008	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
TLE		2008	Tlemcen	Pomme de terre	Spunta	A2
AD		2008	Ain Defla	Tomate	Actana	A1
ITCMI	1, 3	2008	Oran	Tomate	Zahra	A1
G28		2008	Oran	Pomme de terre	Spunta	A2
G33		2008	Oran	Pomme de terre	Spunta	A2
CBT	2, 3	2008	Oran	Tomate	Aicha	A1
MISS II	2	2008	Oran	Pomme de terre	Spunta	A1
ADF	2	2010	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
OH1		2010	Mascara	Pomme de terre	Spunta	A2
OH2		2010	Mascara	Pomme de terre	Spunta	A2
MAS1		2010	Mascara	Pomme de terre	Desirée	A2
MAT1		2010	Mascara	Pomme de terre	Desirée	A2
MAT2		2010	Mascara	Pomme de terre	Desirée	A2
MAT3		2010	Mascara	Pomme de terre	Spunta	A2
MAT4		2010	Mascara	Pomme de terre	Spunta	A2
MES1		2010	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
MES1		2010	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
HM1		2010	Mostaganem	Pomme de terre	Bartina	A2
DB1		2010	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
IP2		2010	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
IP3		2010	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
IP1		2010	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
ISO6(SRPV)		2010	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2

## Annexes

ISO2(DA2)		2010	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
SD2	3	2010	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
CHA3	1, 2	2010	Chlef	Pomme de terre	Spunta	A1
ISO12(CHA4)	3	2010	Chlef	Pomme de terre	Spunta	A1
OD5		2011	Chlef	Pomme de terre	Spunta	A1
ISO11		2011	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
HMT1		2012	Mostaganem	Tomate	Agora	A1
HMT7	1, 2, 3	2012	Mostaganem	Tomate	Agora	A1
HMT8	3	2012	Mostaganem	Tomate	Agora	A1
MNP2-12		2012	Mostaganem	Pomme de terre	Atlas	A1
MNP5-12		2012	Mostaganem	Pomme de terre	Atlas	A1
MZP10-12	1	2012	Mostaganem	Pomme de terre	Amoroza	A1
SP4	1	2012	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
AB1P1-12		2012	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A1
AB2P1-12		2012	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A1
AM1P10-12	1	2012	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AM1P11		2012	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AM2P4	1	2012	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
ARP1	2, 3	2012	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A1
BT3		2013	Mostaganem	Tomate	Agora	A1
BT4		2013	Mostaganem	Tomate	Agora	A1
BT5		2013	Mostaganem	Tomate	Agora	A1
BT7		2013	Mostaganem	Tomate	Agora	A1
BT9		2013	Mostaganem	Tomate	Agora	A1
BT11		2013	Mostaganem	Tomate	Agora	A1
BT12		2013	Mostaganem	Tomate	Agora	A1
BT16		2013	Mostaganem	Tomate	Agora	A2
BT17		2013	Mostaganem	Tomate	Agora	A1
ANP1-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
ANP4-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
ANP7-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
ANP8-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
ANP10-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Bartina	A2
HMP2-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Amoroza	A2
HMP3-13	1	2013	Mostaganem	Pomme de terre	Amoroza	A2
HMP10-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
BHMP10-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
MSRP1-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
MSR4-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2

## Annexes

MSR5-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
MNSP2-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
MNP4-13	2	2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
MNSP6-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
MNSP8-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
SRP10-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
SRP15-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
SRP16-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
SRP17-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
MZP15-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
MZP20-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Bartina	A2
MZP23-13		2013	Mostaganem	Pomme de terre	Bartina	A2
AM1P12-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AM2P20-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AM2P23-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AM2P28-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AM2P31-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
2AMP1-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
2AMP2-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
2AMP4-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
2AMP5-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
2AMP6-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
ADP1-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Kondor	A2
ADP3-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Kondor	A2
ADP6-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Kondor	A2
ADP7-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
ADP9-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
ARP2-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
ARP5-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AR2P14-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AR2P15-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AR2P19-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AR2P31-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AB3-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
ABP4-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
ABP6-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AB9-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AB3P1-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AB3P3-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2

**Annexes**

AB3P9-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AB3P12-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
DJ2-13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
DJ13		2013	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A1
AN1-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
AN3-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
AN4-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
AN5-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
AN7-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
AN8-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
AN9-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
AN10-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
HM1-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
HM2-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
HM3-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
SL1-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Amoroza	A2
SL2-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Amoroza	A2
SL4-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Amoroza	A2
SL5-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Amoroza	A2
SL6-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Amoroza	A2
SL7-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Amoroza	A2
SL8-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Amoroza	A1
SL9-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Amoroza	A2
SL10-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Amoroza	A2
SL11-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Amoroza	A2
MND1-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
MND2-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
MND3-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A2
MND5-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
MND6-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
MND7-14		2014	Mostaganem	Pomme de terre	Spunta	A1
ARP1-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
ARP3-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
ARP4-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
ARH1-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
ARH2-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
ARH3-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
ARH4-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
MKH1-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Bartina	A2

## Annexes

MKH2-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Bartina	A2
MKH3-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Bartina	A2
SDA1-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
SDA2-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
SDA4-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
SDA5-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
SDA6-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
SDA7-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
SDA8-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AM1-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AM2-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AM3-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A1
AM4-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AM5-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AM6-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A1
AM7-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A1
AM8_14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2
AM9-14		2014	Ain Defla	Pomme de terre	Spunta	A2

**Annexe 9****Données SSR pour l'ensemble des isolats de *P. infestans* testés par les marqueurs microsatellites**

	Pi02	Pi02	Pi02	Pi4B	Pi4B	Pi4B	G11	G11	G11	Pi04	Pi04	Pi04	Pi63	Pi63	Pi63	D13	D13
Génotype	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3	Allèle 1	Allèle 2	Allele3	Allèle 2	Allele3
13_A2_1	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	154	0
13_A2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13_A2_1	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	154	0
13_A2_50	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	138	154
misc	258	268	0	217	217	0	168	206	0	166	170	0	273	279	0	154	0
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_1	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	154	0

## Annexes

13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_1	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	0	0	0	154	0
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2?	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	154	0
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
misc	268	268	0	205	213	0	142	142	0	166	170	0	279	279	0	136	0
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
misc	268	268	0	213	217	0	142	162	0	166	170	0	279	279	0	136	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	279	136	0
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	279	136	0
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154

**Annexes**

23_A1	266	268	270	213	217	0	142	156	206	170	170	0	270	279	0	206	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	0	0	0	270	273	279	136	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	168	168	0	270	273	279	136	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	0	0	0	270	273	279	136	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	0	136	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	279	136	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	0	0	0	270	273	279	136	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	279	136	0
13_A2_61	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	152
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_22	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	144	154
13_A2_22	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	144	154
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	279	136	0

## Annexes

13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_22	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	144	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
misc_clone?	268	268	0	213	217	0	142	160	0	166	170	0	279	279	0	138	0
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
misc_clone?	268	268	0	213	217	0	142	160	0	166	170	0	279	279	0	138	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	0	166	170	0	0	0	0	136	0
misc_clone?	268	268	0	213	217	0	142	160	0	166	170	0	279	279	0	138	0
23_A1	266	268	272	213	217	0	142	156	206	170	170	0	270	279	0	210	0
misc	268	270	0	213	217	0	162	206	0	0	0	0	270	279	0	136	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	0	136	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	279	140	0
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
23_A1	266	268	270	213	217	0	142	156	206	170	170	0	270	279	0	206	0
23_A1	266	268	270	213	217	0	142	156	206	170	170	0	270	279	0	206	0
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_68	266	268	0	205	213	0	154	160	164	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_22	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	144	154
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	279	136	0

**Annexes**

2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	279	136	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	0	166	170	0	0	0	0	136	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	0	166	170	0	270	273	279	136	0
13_A2	266	266	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	0	0	0	154	0
misc	268	270	0	213	217	0	162	210	0	168	168	0	270	279	0	136	0
13_A2_22	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	144	154
13_A2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23_A1	266	268	270	213	217	0	142	156	206	170	170	0	270	279	0	206	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	279	136	0
13_A2_101	266	268	0	205	213	0	158	160	164	166	170	0	273	279	0	140	158
23_A1	266	268	270	213	217	0	142	156	206	170	170	0	270	279	0	206	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	279	136	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	279	136	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	208	166	170	0	270	273	279	136	0
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_86	266	268	0	205	213	0	152	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_61	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	152

**Annexes**

2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	279	136	0
13_A2_61	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	152
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_1	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	0	0	0	154	0
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	279	136	0
13_A2_22	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	144	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_22	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	144	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_22	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	0	0	0	144	154
13_A2_61	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	152
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	279	136	0

## Annexes

---

13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154
13_A2_50	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	138	154
2_A1	258	268	0	217	217	0	154	156	206	166	170	0	270	273	279	136	0
13_A2_2	266	268	0	205	213	0	154	160	0	166	170	0	273	279	0	140	154

## Annexe 10

### Caractéristiques du fongicide utilisé pour le test de résistance des isolats au métalaxyl

Nom commercial : Ridomil 25 WP, Novartis expérimental compound.

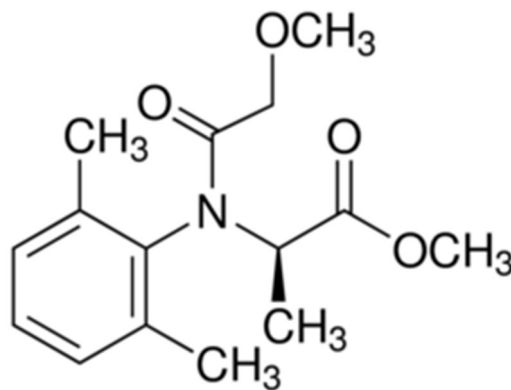
Matière active : Métalaxyl

Formule chimique : methyl N-(methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)-DL-alaninate.

Famille chimique : Phénylamide

Forme : cristaux blancs à beiges

Solubilité : soluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques.



Structure chimique du métalaxyl (C<sub>15</sub> H<sub>21</sub> NO<sub>4</sub>)