

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Agronomiques



THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : Sciences Agronomiques

Par

Mr. BETTOUATI ABDELKADER

Thème :

Etude de la diversité phénotypique et génotypique de *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., dans des régions de l'ouest Algérien

Soutenue le 23/01/2023, devant le jury composé de :

M ^{me} .Hamdani Fatma Zohra	MCA	U. Hassiba Benbouali de Chlef	Président
M ^{me} .Meziane Malika	MCA	U. Hassiba Benbouali de Chlef	Rapporteur
Mr. Bekada Ahmed Mohammed Ali	Professeur	U. El Wancharissi de Tissemsilt	Examineur
Mr. Bekkar Ahmed Amine	MCA	U. Mustapha Stambouli de Mascara	Examineur
Mr. Mohammdi Ahmed	MCA	U. Hassiba Benbouali de Chlef	Examineur
M ^{me} . Zaim Souad	MCA	U. Mustapha Stambouli de Mascara	Examinatrice

Année Universitaire 2022- 2023

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Allah le tout puissant pour m'avoir donné le courage, la force, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent à Mme **Hamdani Fatma Zohra**, Maitre de conférences à la faculté SNV de l'université de Chlef, d'avoir accepté de présider le jury et d'examiner ce travail.

Un grand merci à Mme **MEZIANE Malika**, Maitre de conférences à la faculté SNV de l'université de Chlef, pour avoir accepté de diriger ce travail, qu'elle trouve ici, l'expression de ma profonde reconnaissance, pour ses précieux conseils, ses orientations et ses encouragements, qu'elle trouve ici le témoignage de mes profonds remerciements.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Mr **SETTI Benali** Professeur à la faculté SNV de l'université de Chlef, pour avoir assuré la direction scientifique de ce travail. Merci pour son implication dans ma thèse, sa bienveillance et son soutien. J'espère qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je souhaiterais remercier les membres de mon jury de thèse: Mr.**BEKADA Ahmed Mohamed Ali** professeur à l'université de Tissemsilt, Mr. **BEKKAR Ahmed Amine** Maitre de conférences à l'université de Mascara Mr. **MOHAMMDI Ahmed** Maitre de conférences à la faculté SNV de l'université de Chlef, ainsi que Mme. **ZAIM Souad**, Maitre de conférences à l'université de Mascara qui ont bien voulu donner de leur temps précieux pour juger cette thèse pour l'examinassions et toutes les remarques constructives à ce travail.

Un grand merci à Mme **OUAZANI Karima**, Directrice de la Station Régionale de la Protection des Végétaux (SRPV) de Mostaganem, de m'avoir autorisé à réaliser une partie de mes expériences au sein de son laboratoire, je suis très reconnaissant envers toute l'équipe de la SRPV pour leurs conseils et l'interet qu'ils ont accordé à mes travaux.

Un grand merci à Mme **HAMDI Samia**, attachée de recherche à URO (Unité de recherche Ouest de l'INRAA à Sidi Bel Abbès) qui nous a fourni des lignées différentielles et locales de pois chiche que nous avons utilisé pour la réalisation de ce travail, je la remercie pour ses conseils, aide et orientations.

Je souhaite remercier Mr **KERKOUH Mohammed** Gérant de DIAG-GENE, pour son assistance technique lors de mes premiers pas vers la biologie moléculaire.

Je souhaite remercier vivement Dr. **SI MOHAMMED Abdesslem**, de l'université Ahmed Zabana de Relizane pour sa précieuse aide dans l'étude statistique de mes résultats

Je remercie également tous les agriculteurs questionnés pour leurs contributions, leurs aides et disponibilités.

Enfin je termine mes remerciements à toute personne qui a donné un coup de main de près ou de loin à ce travail.

Abdelkader

Dédicace

*Je dédie ce travail et le fruit de plusieurs années
d'études et de sacrifices ;*

*À mon père que je souhaite une longue vie, santé et
prospérité*

*A ma très chère mère, Ta bonté, Ta patience et ton
dévouement ont fait de moi la personne que je suis
aujourd'hui*

*À ma femme pour sa patience, ces encouragements et
son soutien moral qui représentent pour moi le pilier de tous
mes efforts*

À mes chères sœurs : Maghnia, Kheira et Aïcha

*À mes chers frères : Snouci, Tayeb, Boualem et
Mustapha*

*À mes amis et mes collègues chacun par son nom, pour
leur aide et soutien moral.*

Et à tous ceux que ma réussite leur tient à cœur.

Abdelkader

Résumé : Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est l'une des légumineuses les plus importantes en Algérie. L'anthracnose causée par *Ascochyta rabiei* paraît être l'une des maladies la plus redoutable sur la culture de pois chiche. L'enquête effectuée dans cinq régions de l'ouest Algérien a permis de déceler la présence des symptômes typiques de l'anthracnose dans toutes les zones prospectées. Une caractérisation morphologique, pathogénique, physiologique, lutte chimique et moléculaire de l'agent causal *A. rabiei* a été réalisée, ainsi que l'estimation de l'incidence de la maladie sur terrain. La maladie présente une incidence et une sévérité moyenne dans toutes les régions prospectées et qui varie de 29,40 % à 4,10%. L'isolement du champignon a permis de mettre en évidence 16 isolats de *A. rabiei* et la distinction de 2 morphotypes différents : rasant et aérien. L'étude biométrique a révélée une variabilité dans la longueur et la largeur des pycnidiospores ($5,13 \times 16 \mu\text{m}$ à $2,22 \times 7,55 \mu\text{m}$) des différences significatives ($P < 0,05$) ont été mises en évidence dans la comparaison du taux de sporulation des isolats de *A. rabiei*. Le nombre de conidies varie de $2,25 \times 10^5$ spores/ml pour isolat SB1 à 12×10^5 spores/ml pour isolat REL1. L'étude physiologique révèle une meilleure croissance mycélienne des isolats de *A. rabiei* sur milieu CSMDA à pH 5,5, avec une température optimale de 25°C et sous une photopériode de 12 heures. Le test de pathogénicité des isolats a révélé leur pouvoir pathogène sur les gousses et tiges de pois chiche par l'apparition des symptômes typiques d'anthracnose. L'étude de l'agressivité a permis de mettre en évidence trois niveaux d'agressivité des isolats à savoir hautement agressifs, moyennement agressifs et non agressifs. Un comportement variétale variable des lignées du pois chiche vis-à-vis à l'*A. rabiei* a été observé. L'existence d'un pathotype III (très agressif) dominant a été dépistée dans quatre régions (Mascara, Sidi Bel Abbès, Mostaganem et Relizane). L'effet *in vitro* et *in vivo* des fongicides systémiques du groupe des benzimidazoles (Benomyl et Carbendazime) sur la croissance mycélienne des isolats de *A. rabiei*, et l'incidence de la maladie ont été observés. Le taux d'inhibition (IT %) de la croissance mycélienne varie entre 48% et 90,47 % selon l'isolat, le pourcentage d'inhibition élevé a été enregistré avec le carbendazime (52,38 % et 90,47 %) et (48 % et 60 %) pour le benomyl. Le taux de réduction de la sévérité de la maladie des ces fongicides varie entre 29% et 78%. L'étude moléculaire des isolats de *A. rabiei* par l'identification ITS et le Mating type (MATs) a montré que tous nos isolats appartenaient à l'espèce *Ascochyta rabiei* (99 % à 100 %). Les amorces MATs utilisés ont révélé la présence de deux mating type (MAT1-1 et MAT1-2).

Mots clés : Pois chiche, *Cicer arietinum*, *Ascochyta rabiei*, caractérisation du pathogène pathotypes, mating type, variabilité pathogénique.

Abstract: Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is one of the most important legumes in Algeria. Anthracnose caused by *Ascochyta rabiei* appears to be one of the most serious diseases in chickpea cultivation. The investigation carried out in five regions of western Algeria made it possible to detect the presence of typical symptoms of anthracnose in all the areas surveyed. A morphological, pathogenetic, physiological, chemical control and molecular characterization of the causative agent *A. rabiei* was carried out, as well as the estimation of the incidence of the disease in the field. The disease has an incidence and an average severity in all the regions surveyed and which varies from 29.40% to 4.10%. The isolation of the fungus made it possible to highlight 16 isolates of *A. rabiei* and the distinction of 2 different morphotypes: grazing and aerial. The biometric study revealed variability in the length and width of the pycnidiospores ($5.13 \times 16 \mu\text{m}$ to $2.22 \times 7.55 \mu\text{m}$) significant differences ($P < 0.05$) were highlighted in the comparison of the sporulation rate of *A. rabiei* isolates. The number of conidia varies from 2.25×10^5 spores/ml for isolate SB1 to 12×10^5 spores/ml for isolate REL1. The physiological study reveals better mycelial growth of *A. rabiei* isolates on CSMDA medium at pH 5.5, with an optimum temperature of 25°C and under a photoperiod of 12 hours. The pathogenicity test of the isolates revealed their pathogenic power on chickpea pods and stems by the appearance of typical symptoms of anthracnose. The study of aggressiveness made it possible to highlight three levels of aggressiveness of the isolates, namely highly aggressive, moderately aggressive and non-aggressive. A variable varietal behavior of chickpea lines against to *A. rabiei* was observed. The existence of a dominant pathotype III (very aggressive) was detected in four regions (Mascara, Sidi Bel Abbès, Mostaganem and Relizane). The *in vitro* and *in vivo* effect of systemic fungicides from the benzimidazole group (Benomyl and Carbendazime) on mycelial growth of *A. rabiei* isolates, and disease incidence were observed. The rate of inhibition (IT%) of mycelial growth varies between 48% and 90.47% depending on the isolate, the high percentage of inhibition was recorded with carbendazime (52.38% and 90.47%) and (48% and 60%) for benomyl. The disease severity reduction rate of these fungicides ranges from 29% to 78%. Molecular study of *A. rabiei* isolates by ITS identification and Mating type (MATs) showed that all our isolates belonged to the species *Ascochyta rabiei* (99% to 100%). The MAT primers used revealed the presence of two mating types (MAT1-1 and MAT1-2).

Keywords: Chickpea, *Cicer arietinum*, *Ascochyta rabiei*, characterization of the pathogen pathotypes, mating type, pathogenic variability.

ملخص :

يعتبر الحمص (*Cicer arietinum* L.) من أهم الباقوليات في الجزائر. من بين الأمراض الفطرية التي تصيب هذا المحصول لفحة الأنثراكنوز anthracnose، الذي يتسبب في حدوث الفطر *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. يعتبر أخطر الأمراض الذي يسبب تلف نبات الحمص، تم إجراء مراقبة ومعاينة في خمس مناطق من الغرب الجزائري، مما مكننا وسمح لنا من الكشف عن وجود أمراض لفحة الأنثراكنوز في مختلف المناطق التي تمت فيها المعاينة بهدف تمييز ووصف هذا الفطر الإراضي للنبات من الناحية المورفولوجية، التنوع الإراضي، الفيزيولوجية، المعالجة الكيميائية والدراسة الجزيئية للعامل المسبب لـ *A. rabiei* وكذلك تقدير حالة المرض عن طريق خرجات ميدانية. إن المرض موجود في مختلف المناطق التي تمت معاينتها، حيث أن معدل مدى انتشار المرض وشدته يصل إلى 29,40 % و 4,10 % على التوالي. سمحت تقنيات العزل والتعريف المختلفة والمستعملة في هذه الدراسة من الممكن توضيح بعض الجوانب المورفوبيو مترية الزراعية لـ 16 عزلة من *A. rabiei*، مكنت دراسة الخصائص المورفولوجية من التمييز بين نمطين مختلفين: مسطح وهوائي، والتنوع في مظهر اللون بين الأوساط الزراعية الصغيرة والكبيرة، كذلك كشفت دراسة القياسات الحيوية أو بيومترية عن تباين في طول وعرض الأبواغ pycnidiospores (5,13 × 16 ميكرومتر) إلى (2,22 × 7,55 ميكرومتر) على التوالي. كما أظهرت مقارنة معدل نمو الأبواغ فوق معتبرة ($P < 0,05$) حيث يختلف عدد الكونيديا conidies من $2,25 \times 10^5$ بوغة/مل للعزلة SB1 إلى $12,5 \times 10^5$ بوغة/مل للعزلة REL1. كشفت الدراسة الفيزيولوجية للعزلات أن الوسط الزراعي الأكثر ملائمة لنمو الفطر *A. rabiei* هو الوسط المحضر من الحمص (CSMDA)، ودرجة حرارة مثلى 25°C ودرجة حموضة قدرها 5,5. و تحت فترة ضوئية مدتها 12 ساعة. كشف اختبار الإراضية أن عزلات *A. rabiei* هي ممرض لنبات الحمص وسببت أعراض لفحة الأنثراكنوز على الأعضاء الهوائية (السيقان والقرون)، كشفت دراسة الشراسة عند ثلاث مستويات مختلفة للعزلات: عزلات شديدة الشراسة، عزلات معتدلة الشراسة، عزلات غير شراسة. أظهرت دراسة سلوك المتنوع للسلالات الحمص المختبرة ضد الفطر الـ *A. rabiei* وجود النمط المرضي الثالث Pothotype III (شديد الشراسة) الأكثر انتشارا في أربع مناطق التي تمت فيها الفحص و المعاينة (معسكر، سيدي بلعباس، مستغانم، غليزان). لوحظ تأثير (*In vitro*) و (*In vivo*) لمبيدات الفطرية الجهازية من مجموعة benzimidazole (benomyl et carbendazime) على نمو ميسيليوم لعزلات *A. rabiei* وانتشار المرض. نسبة التشبيط (TI %) لنمو الفطر يتغير بين 48 % و 90,47 % حسب العزلة. سجلت أعلى نسبة تشبيط لـ carbendazime (52,38 % و 90,47 %) و (48 % و 60 %) بالنسبة لـ benomyl. يتراوح معدل الانخفاض لشدة المرض لهذه المبيدات الفطرية بين 29 % و 78 %. أظهرت الدراسة الجزيئية لعزلات *A. rabiei* بواسطة تقنية التعريف (ITS) وتحديد نوع التزاوج (MATs)، أن جميع عزلاتنا تنتمي إلى النوع *Ascochyta rabiei* (99 % إلى 100 %)، أظهرت البادئات الـ MATs المستعملة عن وجود نوعين من التزاوج (MAT1-1 و MAT1-2).

الكلمات المفتاحية : حمص، *Cicer arietinum* L.، *Ascochyta rabiei*، تمييز الفطر، نمط ممرض، نوع التزاوج، التنوع الإراضي..

Liste des figures

Page

Figure 01: Distribution et production des pois chiche Desi et Kabuli à travers le monde.....	05
Figure 02 : Types de pois chiche (<i>Cicer arietinum</i> L.).....	07
Figure 03 : Morphologie de <i>Cicer arietinum</i> L	08
Figure 04 : Différents organes de <i>Cicer arietinum</i> L	09
Figure 05: Gousses et graines de <i>Cicer arietinum</i> L. (Ex : ILC 482)	10
Figure 06 : Cycle de culture de pois chiche	12
Figure 07: Evolution de la production, de la superficie et de rendement de pois chiche dans le monde	14
Figure 08 : Pourcentage de production du pois chiche par continent en 2013.....	14
Figure 09: Évolution de la culture du pois chiche en Algérie.....	16
Figure 10: Zones d'aptitude de la culture du pois chiche en Algérie	17
Figure 11 : Distribution géographique de l'antracnose en Algérie.....	23
Figure 12 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>A.rabiei</i> observés au G x100.....	25
Figure 13 : Pseudothèque et asque de <i>Didymella rabiei</i>	26
Figure 14 : Symptômes de l'antracnose sur le pois chiche	28
Figure 15 : Cycle biologique de l'antracnose du pois chiche causé par <i>A. rabiei</i>	32
Figure 16 : Processus de l'infection de <i>A. rabiei</i> sur le pois chiche	33
Figure 17 : Structure des Solanapyrones	35
Figure 18 : Structure chimique de Cytochalasine D.....	35
Figure 19: Régions prospectées : sources des échantillons de pois chiche pour la détection de <i>A. rabiei</i>	47
Figure 20 : Plantes de pois chiche présentant les symptômes de l'antracnose (Région de Mostaganem)	50
Figure 21 : Isolement à partir des fragments de tige sur milieu de culture CSMDA	53
Figure 22 : Méthode de conservation des isolats d' <i>A.rabiei</i> sur milieu gélosé.....	55
Figure 23 : Schéma représentatif de la méthode de mesure de la croissance mycélienne.....	58

Figure 24 : Les différents paramètres mesurés des pycnidiospores de <i>A.rabiei</i>	60
Figure 25 : Test de la faculté germinative (Ex : ILC 3279)	62
Figure 26 : Conditions d’obtention des plantules.....	63
Figure 27 : Dispositif des plantes à intérieur des bacs en plastique avant inoculation (Ex : ILC 3279).....	64
Figure 28 : Le dispositif expérimental des 12 lignées de pois chiche inoculées par un isolat de <i>A.rabiei</i> dans des bacs en plastique	64
Figure 29 : Echelle quantitative à 9 points pour la notation des réactions du pois chiche à <i>A rabiei</i>	66
Figure 30 : Schéma de préparation de l’inoculum et inoculation des plantules de pois chiche.....	68
Figure 31 : Dispositif expérimental des plantes à intérieur des bacs en plastique avant inoculation (Ex : ILC 1929).....	69
Figure 32 : Vue générale du dispositif expérimentale.....	72
Figure 33 : Dispositif expérimental de l’inoculation des folioles de pois chiche par les isolats de <i>A.rabiei</i>	73
Figure 34 : Protocole expérimental de purification d’ADN.....	77
Figure 35 : L’arrangement des gènes et des séquences intergénique nucléaire et la localisation de l’ITS1 et ITS4.....	79
Figure 36 : La méthodologie choisie pour la caractérisation moléculaire des isolats.....	81
Figure 37 : Dépistage de l’anthracnose de pois chiche dans les régions prospectées	83
Figure 38 : Parcelles de pois chiche prospectées (Sidi Ali- Mostaganem)	84
Figure 39 : Incidence moyenne de l’anthracnose du pois chiche durant la campagne agricole 2015/2016.....	85
Figure 40 : Moyenne régionale (en %) de l’incidence de l’anthracnose du pois chiche durant la campagne agricole 2015/2016.....	85
Figure 41 : La sévérité de la maladie moyenne durant la campagne agricole 2015/2016.....	86
Figure 42 : Aspects cultureux des isolats de <i>Ascochyta rabiei</i> sur milieu de culture CSMDA originaires de l’ouest algérien	88
Figure 43 : Aspects macroscopiques des isolats de <i>Ascochyta rabiei</i> sur milieu de culture CSMDA sous les conditions (T° et la photopériode)	91

Figure 44 : Aspect microscopique de <i>Ascochyta rabiei</i>	93
Figure 45 : La faculté germinative des lignées de pois chiche après 10 jours de culture.....	96
Figure 46 : Moyenne de degrés de sévérité de la maladie sur la ligne sensible ILC 263.....	97
Figure 47 : Symptômes de <i>A.rabiei</i> sur ILC 263.	98
Figure 48 : Moyenne d'agressivité des isolats de <i>A. rabiei</i>	100
Figure 49 : Symptômes d'antracnose sur plantes de pois chiche.....	100
Figure 50 : Réaction des lignées de pois chiche à <i>A. rabiei</i>	102
Figure 51 : Corrélation entre l'agressivité et la sporulation des isolats de <i>A.rabiei</i> testées.....	104
Figure 52 : Distribution géographique des pathotypes de <i>A.rabiei</i> dans les régions prospectées de l'ouest algérien.....	106
Figure 53 : Moyenne de distribution des pathotypes (en %).....	107
Figure 54 : Symptômes de l'antracnose.	107
Figure 55A : Croissance mycélienne des isolats de <i>A.rabiei</i> sur les différents milieux de culture testés (culture de 14 jours).....	111
Figure 55B : L'effet de différents milieux de culture testés sur la croissance mycélienne de <i>A.rabiei</i> après 14 jours d'incubation.....	111
Figure 56A : Effet de la quantité de lumière sur la croissance mycélienne des isolats de <i>A.rabiei</i> après 14 jours d'incubation.....	113
Figure 56B : Aspects des colonies de <i>A.rabiei</i> (verso) avec différents temps d'éclairage, après 14 jours d'incubation.....	113
Figure 57A : Effet de la température sur la croissance mycélienne des isolats de <i>A.rabiei</i> , après 14 jours d'incubation.....	115
Figure 57B : Aspects des colonies de <i>A.rabiei</i> avec différents degrés de température, après 14 jours d'incubation.....	115
Figure 58A : Effet de différents pH sur la croissance mycélienne des isolats de <i>A.rabiei</i> , après 14 jours d'incubation.....	118
Figure 58B : Aspects des colonies de <i>A.rabiei</i> (verso) avec différents pH, après 14 jours d'incubation.....	118
Figure 59A : Effet <i>In vitro</i> des fongicides (Benomyl et Carbendazime) sur la croissance mycélienne des isolats de <i>A. rabiei</i> (culture de 10 jours).....	122

Figure 59B : Aspects des colonies de <i>A.rabiei</i> sous l'effet de Benomyl sur la croissance mycélienne à la concentration 1.5g/l, après 10 jours d'incubation.....	122
Figure 59C : Aspects des colonies de <i>A.rabiei</i> sous l'effet de Carbendazime sur la croissance mycélienne à la concentration 0.5g/l, après 10 jours d'incubation.....	123
Figure 60 : Taux d'inhibition (TI en %) de la croissance mycélienne de <i>A.rabiei</i> sous l'effet du Benomyl et de la Carbendazime	123
Figure 61A : Réduction de la sévérité de l'antracnose (en %) du pois chiche sous l'effet de Benomyl et Carbendazime.....	125
Figure 61B : Réduction moyenne de la sévérité de l'antracnose (en %) des pois chiche sous l'effet de Benomyl et Carbendazime.....	125
Figure 62 : Symptômes de <i>A. rabiei</i> sur folioles de pois chiche sous l'effet de deux fongicides (Benomyl et Carbendazime).....	126
Figure 63 : Profils électrophorétiques sur gel d'agarose dont l'amplification par PCR des régions ITS1 et ITS4 de l'ADN des différents isolats de <i>A. rabiei</i>	130
Figure 64 : La séquence ITS1 obtenue pour l'isolat MSC1.....	132
Figure 65 . L'assemblage de la séquence ITS1 et ITS4 obtenus pour l'isolat MSC1.....	134
Figure 66 . L'arbre phylogénétique montrant la relation entre les 16 souches isolées réalisés à partir de séquence de l'ITS.....	135
Figure 67 : Amplification par PCR multiplex des idiomorphes de Mating types avec la combinaison de trois amorces utilisant 16 isolats de <i>A. rabiei</i> de la population d'Algérien.....	136
Annexes	
Figure 68 : Observation microscopique sur la cellule de <i>Malassez</i> (x10)	I
Figure 69 : Technique d'estimation des dimensions de la longueur et de la largeur des pycnidiospores de <i>A.rabiei</i>	III

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1 : Composition biochimique du pois chiche (pour 100 g de poids frais) (Namvar et Sharifi, 2011).....	6
Tableau 2: Durées des stades de développement phénologiques d'une culture de pois de pois chiche	13
Tableau 3: Caractéristiques des principales variétés de pois chiche cultivées en Algérie	18
Tableau 4: Les principales maladies fongiques les plus importantes du pois chiche (in Tlemsani M, 2010)	19
Tableau 5: Principales maladies virales affectant le pois chiche (Nene et <i>al.</i> , (2012) ; Schwinghamer et Larsen (2011).	20
Tableau 6: Principales maladies bactériennes affectant le pois chiche (Shroeder, 2011).	21
Tableau 7: Données sur les pertes quantitatives causées par <i>Ascochyta rabiei</i> chez certains pays (Nene et Sheila, 1992).	23
Tableau 8: Les parcelles prospectées du pois chiche de cinq régions choisies dans l'ouest Algérien (Campagne 2015-2016).....	49
Tableau 9 : Origine géographique et désignation des isolats de <i>A. rabiei</i> dans l'ouest Algérien.	52
Tableau 10. Différentes lignées de pois chiche et leurs origines (INRASBA, 2017)	61
Tableau 11. Echelle quantitative à 9 points pour la notation des réactions du pois chiche à <i>A.rabiei</i>	65
Tableau 12: Degrés de l'agressivité de <i>A.rabiei</i> et la réaction des lignées de pois chiche. (Jamil et <i>al.</i> , 2002).....	66
Tableau 13: Fongicides systémiques utilisées pour le test <i>In vitro</i> (Goodwin, 2008)	71
Tableau 14. Protocole expérimental de l'essai.....	72
Tableau 15: Critères macroscopiques des seize (16) isolats de <i>A. rabiei</i> , 15 jours après leur culture sur milieu CSMDA. pH = 5,8.....	90
Tableau 16: Critères microscopiques de seize (16) isolats de <i>A. rabiei</i> , 15 jours après leur culture sur milieu CSMDA, pH = 5,8.....	93
Tableau 17: Analyse de la variance de la croissance mycélienne, de la sporulation et de la taille des conidies (Test de Newman-Keuls- Seuil = 5%) (Culture de 15 jours)	94
Tableau 18: Périodes d'incubation et de latence (en jours) des isolats de <i>A. rabiei</i>	99
Tableau 19. Groupes homogènes de degré de l'agressivité des isolats de <i>A. rabiei</i> sur 12	

lignées de pois chiche testées (test de Newman-Keuls = 5%).	101
Tableau 20: Sévérité de l'antracnose sur les lignées de pois chiche testées (10 jours après l'inoculation).	102
Tableau 21: Groupes homogènes de la réaction des lignées de pois chiches après l'inoculation par 10 isolats de <i>A. rabiei</i> (test de Newman-Keuls = 5%).	102
Tableau 22: Réaction des lignées de pois chiche testés vis-à-vis des isolats de <i>A. rabiei</i> .	103
Tableau 23: Analyse de variance du pouvoir pathogène des isolats étudiés de <i>A. rabiei</i> (10 jours après l'inoculation) (Le test de Newman –Keuls à 1%).	103
Tableau 24: Classement des dix (10) isolats de <i>A. rabiei</i> en pathotypes par l'utilisation de trois lignées de pois chiche testés.	106
Tableau 25: Analyse de variance du test de pathogénicité des isolats de <i>A. rabiei</i> (15 jours après l'inoculation) par les lignées différentielles de pois chiche testées.	108
Tableau 26: Différents pathotypes de <i>A. rabiei</i> (après l'inoculation de lignées de pois chiche différentielles).	108
Tableau 27: Croissance mycélienne des isolats de <i>A. rabiei</i> sur les différents milieux de culture testés (culture de 14 jours).	110
Tableau 28 : Analyse de la variance de la croissance mycélienne (culture de 14 jours) obtenus sur les différents milieux de culture testés (Test de Newman- Keuls-Seuil =5%)	112
Tableau 29 : Croissance mycélienne des isolats de <i>A. rabiei</i> obtenu sous l'effet de la lumière alternée (Photopériode de 12h, Lumière continue et Obscurité continue) (Culture de 14 jours).	113
Tableau 30: Analyse de la variance de la croissance mycélienne (culture de 14 jours) obtenus sous l'effet de la lumière alternée (Photopériode de 12 H, Lumière continue et obscurité continue) (Test de Newman –Keuls-Seuil = 5%).	114
Tableau 31: Croissance mycélienne des isolats de <i>A. rabiei</i> obtenue sous l'effet de degrés de la température (5°C, 15°C, 20°C, 25°C et 35°C) (Culture de 14 jours).	115
Tableau 32: Analyse de la variance de la croissance mycélienne (culture de 14 jours) obtenus sous l'effet de degrés de la température (5°C, 15°C, 20°C, 25°C et 35°C) (Test de Newman –Keuls-Seuil = 5%).	116
Tableau 33: Croissance mycélienne des isolats de <i>A. rabiei</i> obtenue sous l'effet de différents pH (pH 4, pH 5.5, pH 7 et pH 8) (Culture de 14 jours).	116
Tableau 34. Analyse de la variance de la croissance mycélienne (culture de 14 jours) en fonction du pH (pH 4, pH 5.5, pH 7 et pH 8) (Test de Newman –Keuls-Seuil = 5%)	118

Tableau 35. Analyse de la variance des isolats en fonction des moyennes de croissance mycélienne de <i>A.rabiei</i> sous l'effet du benomyl et de la carbendazime (test de Newman-Keuls = 5%).	124
Tableau 36. Réduction de l'incidence de l'anthracnose (RIM %) sur les trois lignées de pois chiche sous l'effet du benomyl et du carbendazime.	124
Tableau 37. L'identité des isolats sur la base des séquences ITS	133
Tableau 38. Distribution des mating types de <i>A. rabiei</i> dans différentes régions dans l'ouest de l'Algérie.	136
Tableau 39. Fréquences et rapports de Mating types des isolats de <i>Ascochyta rabiei</i> déterminés en utilisant une analyse PCR spécifique..	137

Liste des abréviations

ICARDA: International Center for Agricultural Research in the Dry Areas

ICRISAT: The International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics

ITGC: Institut Technique des Grandes Cultures

ICC: International of Chickpea Cultivar

ILC: International Legume of Chickpea

INRA: Institut National de la Recherche Agronomique, Rennes, France.

INRAA/URO: Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie/Unité de Recherche Ouest, Sidi Bel Abbés, Algérie

SRPV : Station Régionale de la Protection des Végétaux

MADR : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural.

DA/quintal : Dinars par quintal

mm/an : Millimètre par an

t/ha : Tonne par hectare

qx/ha : Quintaux par hectare

km : Kilomètre

HR : Humidité relative

UV : Ultra violet

Tween 80 : Polyoxyéthylène-sorbitane-monooléate

µg/ml : Microgramme par millilitre

qsp : Quantité suffisante pour

qx : Quintaux.

µm : Micromètre.

µl : Microlitre.

µg : Microgramme.

FAO: Food Organisation Agricultural.

ADN(r): Acide désoxyribonucléique (ribosomal)

Rnase: Ribonucléase

PCR: Polymerase chain reaction/réaction

ITS: Internal transcribed spacers

MAT: Mating type

NCIB: National Center for Biotechnology Information

dNTP: Désoxynucléotide triphosphate

pb : Paire de bases

Liste des annexes

	Page
Annexe 01 : La composition du milieu de culture CSMDA.....	I
Annexe 02 : Préparation de la suspension des spores.....	I
Annexe 03 : Composition des milieux de culture.....	II
Annexe 04 : L'estimation des dimensions de la longueur et de la largeur des pycnidiospores de <i>A.rabiei</i>	III
Annexe 05 : Les amorces spécifiques utilisées en PCR multiplex.....	III
Annexe 06 : Amplification PCR multiplex MAT (Mixture PCR)	IV
Annexe 07 : Programme température de la PCR	IV
Annexe 08 : Vérification des tailles des fragments MAT.....	IV
Annexe 09 : Incidence moyenne de l'antracnose du pois chiche (en %) durant la campagne agricole 2015/2016.....	V
Annexe 10 : La sévérité de la maladie moyenne durant la campagne agricole 2015/2016...	VI
Annexe 11 : Croissance mycélienne, sporulation et la taille des conidies des isolats de <i>A.rabiei</i>	VI
Annexe 12 : Analyse de variance de la croissance mycélienne, de sporulation et de la taille des conidies des isolats de <i>A. rabiei</i>	VIII
Annexe 13 : Le taux de germination des lignées de pois chiche testées (en %)	VIII
Annexe 14 : Degrés de sévérité moyenne des isolats de <i>Ascochyta rabiei</i> sur la variété sensible de pois chiche (ILC 263).....	IX
Annexe 15 : Notations de degrés de sévérité des symptômes sur les lignées de pois chiche après 10 jours de l'inoculation par les isolats de <i>Ascochyta rabiei</i>	IX
Annexe 16 : Test de Newman-Keuls au seuil de 1 % pour la pathogénicité des isolats sur trois lignées de pois chiche différentielles.....	X
Annexe 17 : Etudes des caractères physico-chimiques et calculs des diamètres des isolats de <i>A.rabiei</i> (culture de 14 jours).....	X
Annexe 18 : La croissance mycélienne des isolats de <i>A.rabiei</i> et le taux d'inhibition sous l'effet de benomyl et carbendazime.....	XII
Annexe 19 : Réduction de l'incidence de l'antracnose (RIM en %) de trois lignées de pois chiche sous l'effet de benomyl et carbendazime.....	XIII
Annexe 20 : Vérification des identifiées des isolats par séquençage.....	XIII
Annexe 21 : Questionnaire.....	XIII

Table des Matières

	Page
Remerciements.....	
Dédicace	
Résumé	
Abstract.....	
ملخص	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Liste des annexes.....	
Introduction générale.....	1

Première partie : Etude bibliographique

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

1.1. Historique, origine et aire de culture	4
1.2. Importance nutritive.....	5
1.3. Taxonomie et description botanique.....	6
1.3.1. Taxonomie.....	6
1.3.2. Description botanique	7
1.3.3. Les espèces de pois chiche	10
1.4. Cycle de culture et exigences édaphi-climatiques.....	10
1.4.1. Cycle et saison du pois chiche.....	10
1.4.2. Exigences édaphi-climatiques de la culture	11
1.5. Importance économique du pois chiche.....	13
1.5.1. Dans le monde	13
1.5.2. En Algérie	15
1.6. Principales variétés de pois chiche cultivées en Algérie	17
1.7. Important problèmes phytosanitaire du pois chiche la culture en Algérie.....	18

Chapitre II : Anthracnose du pois chiche: *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.

2.1. <i>Ascochyta rabiei</i> (Pass.) Labr.:Taxonomie	24
2.2. Description de <i>Ascochyta rabiei</i> (Pass.) Labr	24
2.3. Les symptomatologie de l’anthracnose.....	27
2.4. Biologie et épidémiologie de <i>Ascochyta rabiei</i>	28
2.4.1. Conservation et contamination primaire	28
2.4.2. Contamination secondaire	29

2.5. Effets des facteurs de l'environnement sur le développement de <i>A. rabiei</i>	29
2.5.1. Température.....	30
2.5.2. Durée d'humectation foliaire (Leaf Wetness Period) (LWP).....	30
2.5.3. Humidité relative	31
2.5.4. Lumière	31
2.5.5. Nutrition	31
2.5.6. Le pH.....	31
2.5.7. Facteurs de dissémination	32
2.6. Cycle épidémique	32
2.7. Processus de l'infection de <i>A. rabiei</i>	33
2.8. Pathogénicité	34
2.8.1. Histopathologie.....	34
2.8.2. Les pathotoxines et les enzymes impliquées dans l'infection.....	34
2.8.3. Variabilité du pouvoir pathogène	35
2.9. Les méthodes de la caractérisation de la diversité chez les champignons phytopathogènes	36
2.9.1. Les marqueurs d'expression	36
a. Caractères phénotypiques.....	36
b. Caractères de virulence	36
2.9.2. Marqueurs iso-enzymatiques.....	37
2.9.3. Les méthodes moléculaires	37
a. RFLPs (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>) ou Polymorphisme de longueur de fragment de restriction.....	38
b. La RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic</i>) ou Polymorphisme amplifié aléatoire	39
c. L'AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphic</i>) ou Polymorphisme de longueur de fragment amplifié	40
d. Les microsatellites ou SSR (<i>Simple Sequence Repeat</i>) ou Répétition de séquence simple	41
e. ITSs (<i>Internal Transcribed Spacer</i>) ou Espaceur transcrit interne.....	42
f. SNPs (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>) ou Polymorphisme nucléotidique unique.....	42
2.10. Méthodes de lutte contre l'antracnose « <i>Ascochyta rabiei</i> ».....	42
2.10.1. Lutte culturale.....	43
2.10.2. Lutte chimique	43
2.10.3. Lutte biologique.....	44

2.10.4. Lutte génétique	45
Deuxième partie : Etude expérimentale	
Chapitre III:Matériels et Méthodes	
III.1. Prospection sur terrain	47
Objectif	47
3.1.1. Matériel biologique	48
3.1.1.1. Matériel fongique.....	48
3.1.2. Estimation de l'incidence et de la sévérité de la maladie au champ.....	50
3.2.1. Conservation des échantillons de pois chiche	51
3.2.2. Méthode d'isolement, ...	52
3.2.3. Conservations des isolats de <i>A. rabiei</i>	54
III.2. Etude de quelques facteurs abiotiques sur la croissance de <i>A. rabiei</i>.....	54
3.2.1. Effet du milieu de culture sur la croissance mycélienne de <i>A. rabiei</i>	55
3.2.2. Effet de la lumière sur la croissance mycélienne de <i>A. rabiei</i>	55
3.2.3. Effet de la température sur la croissance mycélienne de <i>A. rabiei</i>	56
3.2.4. Effet du pH sur la croissance mycélienne de <i>A. rabiei</i>	56
3.2.5. Evaluation de la croissance mycélienne de <i>A. rabiei</i>	56
3.2.5.1. En milieu solide	56
3.2.5.2. En milieu liquide.....	56
3.2.6. Traitement statistique	57
III.3. Caractérisation culturelle et morpho-biométriques de <i>A. rabiei</i>	57
3.3.1. Caractérisation culturelle et description de différents morphotypes	57
3.3.2. Caractérisation morphologique de l'agent pathogène.....	57
3.3.2.1. Caractérisation macroscopique de <i>A. rabiei</i>	57
3.3.2.2. Caractérisation microscopique de <i>A. rabiei</i>	59
3.3.3. Caractérisation biométrique des conidies de <i>A. rabiei</i>	60
3.3.3.1. Mensuration des conidies des isolats de <i>A. rabiei</i>	60
3.3.4. Traitement statistique.....	61
III.4. Evaluation de la variabilité pathogénique et détermination des pathotypes de <i>A. rabiei</i>.....	61
3.4.1. Test de la faculté germinative.....	61
3.4.2. Conditions d'obtention des plantules.....	62

3.4.3. Méthodes d'inoculation des plantules (Test d'inoculation).....	63
3.4.4. Notations et évaluations du taux d'infection.....	65
3.4.5. Traitement statistique.....	68
3.5. Détermination des pathotypes de <i>A. rabiei</i>	68
3.5.1. Matériel végétale	69
3.5.2. Inoculation des plantules.....	69
3.5.3. Notation de la maladie	69
III.5. Test de l'efficacité des fongicides systémiques sur la croissance mycélienne des isolats de <i>A. rabiei</i>	70
3.5.1. Matériel végétale	70
3.5.2. Test « <i>In vitro</i> » et « <i>In vivo</i> » de l'efficacité des fongicides	70
3.5.2.1. Test « <i>In vitro</i> » des fongicides avec <i>A. rabiei</i>	70
a. Fongicides étudiés	70
b. Technique et principe de confrontation	71
3.5.2.2. Test <i>In vivo</i> de l'efficacité des fongicides sur folioles de <i>Cicer arietinum</i> L.	72
a. Evaluation des symptômes	73
b. Evaluation de la réduction de l'incidence de l'antracnose (IM en %).....	74
3.5.3. Traitement statistique.....	75
III.6. Identification moléculaire des isolats de <i>A. rabiei</i>	75
3.6.1. Culture et extraction du mycélium de <i>A. rabiei</i>	75
3.6.2. Extraction d'ADN génomique	75
3.6.3. Purification de l'ADN	76
3.6.4. PCR multiplex pour l'ITS et les Mating types (MAT)	78
a. Principe de la PCR.....	78
b. PCR et conditions de réalisation	78
c. Séquençage des régions ITS.....	79
d. Identification des Mating types	79
e. PCR et conditions de réalisation pour l'ITS et Mating type	79
Chapitre IV. Résultats et Discussions	82
IV.1. Prospection sur terrain	82
4.1.1. Evaluation du taux d'infection.....	84
4.1.2. Discussion	86

IV.2.Caractérisation culturelle et morpho-biométrique de <i>A.rabiei</i>	87
4.2.1. Isolement de <i>A.rabiei</i>	87
4.2.2. Variabilité culturelle, morphologique et biométrique de <i>A. rabiei</i>	88
4.2.2.1. Critères macroscopiques	88
4.2.2.2. Critères microscopiques	91
4.2.3. Discussion	94
IV.3. Evaluation de la variabilité pathogénique et détermination des pathotypes de <i>A.rabiei</i>	96
4.3.1. Test de la faculté germinative des lignées de pois chiche.....	96
4.3.2. Etude de la pathogénicité de <i>A. rabiei</i>	97
4.3.2.1. Inoculation sur lignée sensible de pois chiche ILC 263.....	97
4.3.3. Etude de la variabilité pathogénique des isolats de <i>A. rabiei</i>	98
4.3.4. Discussion	104
4.4. Détermination des pathotypes	105
4.4.1. Discussion	108
IV.4.Etude de quelques facteurs abiotiques sur la croissance de <i>A.rabiei</i>	110
4.4.1. Influence des facteurs nutritionnels sur la croissance mycélienne de <i>A rabiei</i>	110
4.4.1.1. Effets des milieux de culture sur la croissance mycélienne de <i>A.rabiei</i>	110
4.4.2.. Effet de quelques facteurs physiques et chimiques sur la croissance mycélienne.	112
4.4.2.1.. Effet de la lumière (l'éclairage) sur la croissance mycélienne de <i>A.rabiei</i>	112
4.4.2.2. Effet de la température sur la croissance mycélienne des isolats de <i>A.rabiei</i>	114
4.4.2.3. Etude de l'effet du pH sur la croissance mycélienne des isolats de <i>A.rabiei</i>	116
4.4.3. Discussion	118
IV.5. Test de l'efficacité des fongicides systémiques sur la croissance mycélienne des isolats de <i>A.rabiei</i>	121
4.5.1. Test <i>In vitro</i> pour le contrôle chimique de <i>A. rabiei</i>	121
4.5.2. Test <i>In vivo</i> pour le contrôle chimique de <i>A.rabiei</i>	124
4.5.3. Discussion	126
IV.6. Identification moléculaire des isolats de <i>A.rabiei</i>	128
4.6.1. Analyse de la pureté de l'ADN.....	128
4.6.2. Séquençage des régions ITS.....	129
4.6.3. Détermination des Mating types (MAT) présents dans l'ouest algérien	135

4.6.4. Discussion.....	137
Conclusion générale et perspectives.....	142
Références bibliographiques.....	146
Annexes.....	I

Introduction générale

Introduction générale

Les légumineuses alimentaires (pois, lentilles, haricots, soja et pois chiches) sont l'une des cultures les plus importantes en raison non seulement de leur qualité nutritionnelle mais également pour leurs divers avantages agro-environnementaux. Les graines et poudres de légumineuses sont des sources importantes de protéines, glucides, vitamines, minéraux et fibres alimentaires (Rachwa- Rosiak et *al.*, 2015 ; FAO, 2019).

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est parmi les espèces des légumineuses les plus cultivées dans le monde (FAO, 2019). Il occupe la troisième place après le Haricot « *Phaseolus vulgaris* L. » et le pois « *Cicer sativum* L. » (Saxena, 1992) est considéré parmi les aliments de base des algériens en particulier, qui est la légumineuse alimentaire la plus préférée d'où, il peut être consommé de plusieurs façons et peut être eu de bonnes propriétés alimentaires. La consommation des graines de pois chiche fournit au consommateur une source importante protéines, ainsi que la paille de pois chiche est utilisée dans l'alimentation et l'engraissement animal (Jukanti et *al.*, 2012).

En Algérie, le pois chiche (*C. arietinum* L.) occupe la deuxième position après la fève-féverole, L'importance alimentaire du pois chiche fait qu'il est très demandé par les ménages algériens. La production nationale qui est en moyenne de 290 000 quintaux, reste insuffisante et ne couvre pas les besoins de consommation de la population qui sont de 816 130 quintaux (DSASI, 2015). Ainsi, le rendement moyen de cette culture n'est seulement que 9,8 q/ha. La majeure partie des superficies cultivées de cette espèce est concentrée à l'ouest du pays, particulièrement, dans les wilayas de Tlemcen et Ain –Temouchent (MARDR, 2014). En effet, l'Algérie est le 5^{ème} plus grand importateur de pois chiche au monde et le 1^{er} en Afrique (FAO, 2019).

Cette faiblesse de rendement est la résultante d'un ensemble de facteurs abiotiques (faible pluviométrie, sécheresse, pH et salinité du sol) et biotiques (mauvaises herbes, ravageurs et maladies dues aux champignons, bactéries et virus), ainsi qu'une sous-utilisation des semences réglementaires (ITGC, 2018). Ces dommages peuvent aussi atteindre la santé humaine par la capacité de certains champignons à synthétiser des mycotoxines (Picot et *al.*, 2012).

L'antracnose maladie cryptogamique causée par *Ascochyta rabiei* figure parmi les maladies les plus redoutables et les plus préjudiciables affectant le pois chiche. Cette maladie peut entraîner des pertes du rendement qui peuvent atteindre 100% pour les variétés sensibles (Bouznad et *al.*, 1996). Mabsoute et *al.*, (1996), signalent qu'en Algérie ainsi que dans

d'autres pays du Maghreb, l'antracnose reste la contrainte majeure et un facteur limitant de la production de pois chiche.

De nombreux moyens de lutte contre *Ascochyta rabiei* ont été envisagés tels que : la rotation des cultures (prophylactiques), l'usage des fongicides (la lutte chimique), l'usage des antagonismes (la lutte biologique) et l'utilisation des variétés résistantes (la lutte génétique) (Gan et *al.*, 2006). Les plantes transgéniques résistantes sont une option nouvelle à laquelle les producteurs ont recours (Davidson et Kimber, 2007).

Les moyens de lutttes sus-citées n'ont pas permis de contrôler efficacement la maladie de l'antrachnose. Ils présentent en plus certains inconvénients relatifs à leur coût particulièrement, la lutte biologique et la transgénése. L'utilisation abusive des fongicides peut développer une résistance chez le champignon et entrainer des risques de toxicité pour l'homme et l'environnement. Les fongicides présentent une efficacité limitée face à l'apparition de nouvelles souches virulentes, de résistance croissante aux cultivars résistants et aux nouvelles générations de pesticides (Gan et *al.*, 2005 ; Rhaiem et *al.* 2006 ; Iqbal et Ghafoor, 2005 ; Errakhi, 2008 ; Armstrong-Cho et *al.*, 2008). Il n'existe pas jusqu'à présent d'agents biologiques permettant d'éradiquer *A. rabiei*.

Les variétés de pois chiche sélectionnées par les méthodes traditionnelles sont obtenues après de nombreuses années de sélection et ne présentent pas une résistance durable qui est liée à un degré élevé de variation génétique du champignon (Singh et *al.*, 2003).

Tout programme de lutte contre l'antracnose du pois chiche et tout programme d'introduction de nouveaux cultivars en Algérie doit s'appuyer sur une bonne connaissance de la variabilité morphologique, pathogénique et la diversité génétique des populations de l'agent pathogène car le stade téléomorphe (*Didymelle rabiei*) , hétérothallique, nécessite la présence de deux types de thalle, MAT1-1 et MAT1-2, pour l'accouplement de la reproduction sexuée. Par ce moyen, le stade téléomorphe contribue à l'hétérozygotie des descendants et à l'obtention de nouvelles combinaisons de virulence, favorisant l'apparition de nouveaux pathotypes (Pande et *al.*, 2005).

Plusieurs recherches réalisées en Algérie sur la variabilité culturale, morphologique pathogénique du champignon montrent une grande variabilité sur différent caractères (Bouznad et *al.*, 1996 ; Labdi, 1990). Cependant des travaux consacrés plus particulièrement à l'étude de la caractérisation moléculaire des populations du champignon ont été abordé (Mahiout, 2017). Dans la présente invistigation, nous avons étudié un aspect génétique par la

recherche entre les caractères phénotypiques et la variabilité génétique des isolats collectées dans les cinq régions de l'ouest Algérien

L'objectif principal de notre travail consiste à étudier par différents outils d'investigations ; **1)** la caractérisation phénotypique (la recherche de la variabilité morphologique, pathogénique, la corrélation, la détermination des pathotypes et étude de quelques aspects physiopathologiques) ; **2)** évaluation de l'effet inhibiteur *in vivo* et *in vitro* de fongicides systémiques (benomyl et carbendazime) sur la croissance mycélienne de *A.rabiei* ; **3)** l'incidence de la maladie ; **4)** la recherche de la variabilité génétique d'une collection d'isolats de *Ascochyta rabiei*, obtenus lors de différentes prospections dans les zones potentielles dans la culture du pois chiche de l'ouest algérien.

Partie I: Etude bibliographique

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

1.1. Historique, origine et aire de culture

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est parmi les premières légumineuses à graines domestiquées par l'homme depuis l'antiquité (Van Der-Maesen, 1987). Le pois chiche est originaire du Moyen-Orient, plus précisément du Sud-Est de la Turquie et de la Syrie (Saxena, 1984). Au cours de sa domestication, le pois chiche semble avoir connu plusieurs centres de diversification, dont le plus ancien serait le plateau Anatolien (Van Der-Maesen, 1984). Il s'est rapidement disséminé dans le monde pour devenir une culture importante des environnements subtropicaux et méditerranéens (Muehlbauer et Rajesh, 2008).

Cette culture a réussi à conquérir plusieurs régions du monde dont la partie septentrionale de l'Afrique. Ainsi, l'Afrique du nord constitue un centre de diversité important pour cette espèce (Zine-Zikara et al., 2015). Cette plante est bien adaptée aux régions semi arides (Guignard et al., 2005).

Labdi (1995) mentionne que Davis (1969) et Ladizinsky (1975) ont découvert deux espèces sauvages au Sud-Est de la Turquie « *Cicer echinospermum* Davis et *Cicer reticulatum* Ladiz». Ces deux espèces ne diffèrent pas beaucoup de l'espèce cultivée. Ladizinsky (1989) a identifié a par analyses protéiques et enzymatiques que *Cicer reticulatum* L. (2n = 16 chromosomes) est l'ancêtre spontané de l'espèce cultivée du pois chiche.

En Algérie, le pois chiche a été cultivé avant la colonisation, néanmoins sa culture reste difficile à maîtriser (Laumont et Chevassus, 1956; Labdi, 1990).

La culture du pois chiche est répandue au niveau mondial dans 4 grandes régions:

- Le sud du continent indien où il assure plus de 85% de la production mondiale.
- Le bassin méditerranéen.
- L'Amérique latine.
- L'Afrique de l'Est (Van Der-Maesen, 1984).

La FAO a listé 51 pays producteurs de pois chiche durant la dernière décade (FAO, 2006).

L'Asie de l'Est est la région la plus productrice du pois chiche à travers le monde (74.9% de la production totale) dont l'Inde fut le pays dominant (65%). Huit autre pays ont atteint plus de 100.000 t durant cette période. Pakistan (7.5 % de la production mondiale), Turquie (7.5 %), Iran (3.4 %), Mexico (2.8 %), Australie (2.4 %), Canada (2.0 %), Ethiopie (1.8 %) et le Myanmar (1.7 %) (Fig.1).

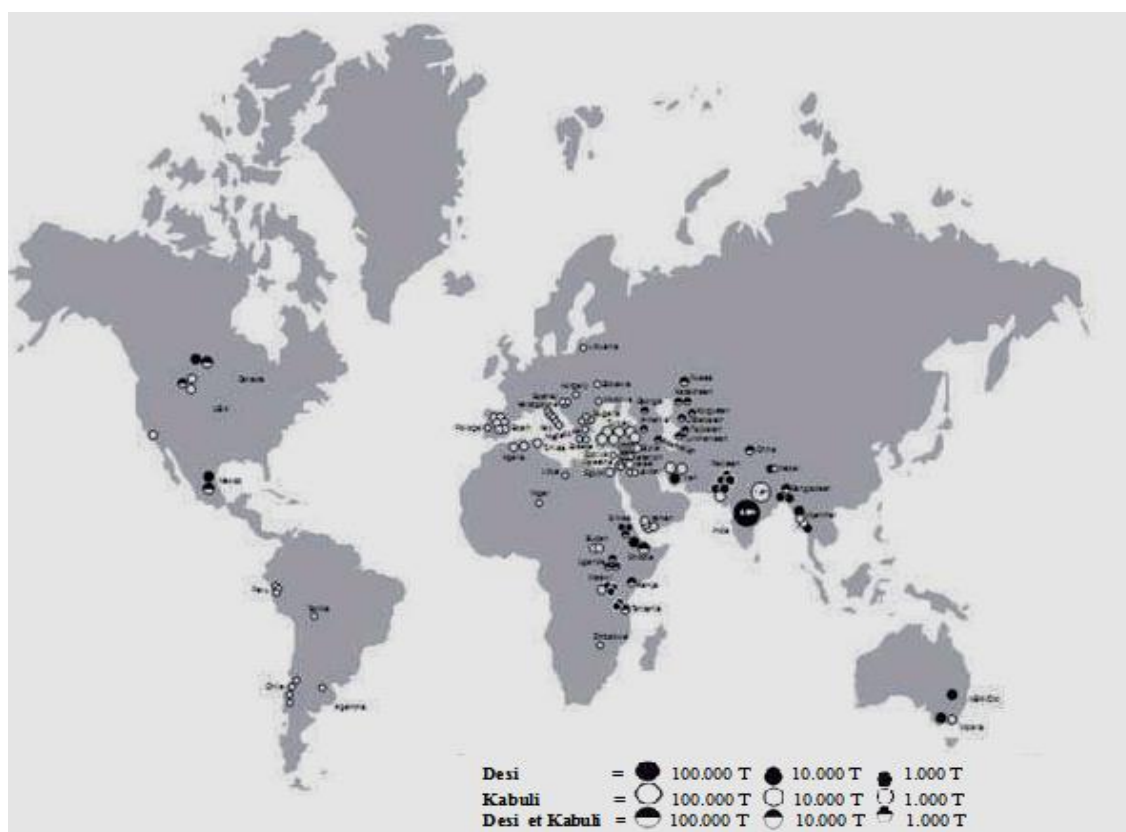


Figure1: Distribution et production des pois chiche Desi et Kabuli à travers le monde (FAO, 2006)

1.2. Importance nutritive

Le pois chiche est destiné, en sa majeure partie, pour la consommation humaine et le reste est utilisé pour le bétail comme fourrage. Il est dépourvu de tout facteur antinutritionnel. Il a également une composition alimentaire très riche en protéines digestibles et contient une fraction lipidique qui renferme des acides non saturés tels que les acides linoléiques et oléiques (Upadhyaya et *al.*, 2001 ; Namvar et Sharifi, 2011 ; Jukanti et *al.*, 2012). Du fait de sa richesse nutritive, le pois chiche rentre dans la composition de plusieurs plats algériens. Il est constitué majoritairement d'un sucre lent (l'amidon 41%), d'un taux appréciable de protéines (23%) (Muehlbauer et Tullu, 1997), de sels minéraux (4%) et de vitamines (0,003%). Il est à

signaler que ses protéines renferment une diversité d'acides aminés et ses matières grasses sont composées d'acides gras essentiels (Ramalho et Portugal, 1990, Muehlbauer et Tullu, 1997) (Tab.1).

Tableau 1 : Composition biochimique du pois chiche (pour 100 g de poids frais) (Desaulnier et Dubost, 2003).

Elément	Quantité	Elément	Quantité
Eau	60 g	Phosphore	132 mg
Lipides	2,6 g	Potassium	335 mg
Fibres	8,6 g	Calcium	56 mg
Protéines	8,9 g	Vitamine B1	0,1 mg
Glucides	27,4 g	Vitamine E	1,2 mg
Magnésium	53 mg		

1.3. Taxonomie et description botanique

1.3.1. Taxonomie

Le genre *Cicer* comprend un grand nombre d'espèces. Van Der-Maessen (1979) a répartie les espèces du genre *Cicer* en trois groupes: Espèces annuelles sauvages,

« *Cicer reticulatum* L.» et « *Cicer echinospermum* P.H.D.», Espèces pérennes sauvages « *Cicer anatolicum* Alef » et une espèce annuelle cultivée « *Cicer arietinum* L. ».

Classification de « *Cicer arietinum* L. » (USDA, 2016)

Règne:	Plantae
Sous règne:	Tracheobionta (plantes vasculaires).
Embranchement:	Spermatophytes (plantes à graines).
Sous embranchement:	Magnoliophyta (=angiospermes, phanerogames ou plantes à fleurs)
Classe:	Magnoliopsida (ou dicotylédones).
Sous classe:	Rosidae
Ordre:	Fabales
Famille:	Fabacées
Genre:	<i>Cicer</i>
Espèce:	<i>Cicer arietinum</i> L.
Nom commun:	Pois chiche

1.3.2. Description botanique

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est une espèce herbacée, annuelle diploïde. Cette espèce manifeste une grande variabilité phénotypique et génotypique. Deux types se distinguent, le type "Kabuli" et le type "Desi" (Fig.2). Le premier, originaire de Kabul, est largement répandu dans le monde (Singh et al., 1983); c'est le seul type cultivé dans le bassin méditerranéen (Jimenez-Diaz et Trapero-Casas, 1988). La collection des lignées de ce type, maintenue à l'ICARDA, est désignée par le préfixe ILC (Reddy et Singh, 1984); leurs graines de couleur crème sont de dimensions variables, petites, moyennes et grandes (Singh et al., 1987). Le deuxième type "Desi", utilisé surtout en Inde, se distingue par la couleur jaune, noire ou rouge de ses semences (Malhotra et al., 1987); la collection de ses lignées maintenue à l'ICRISAT est désignée par le préfixe ICC (Van der Maessen, 1987).

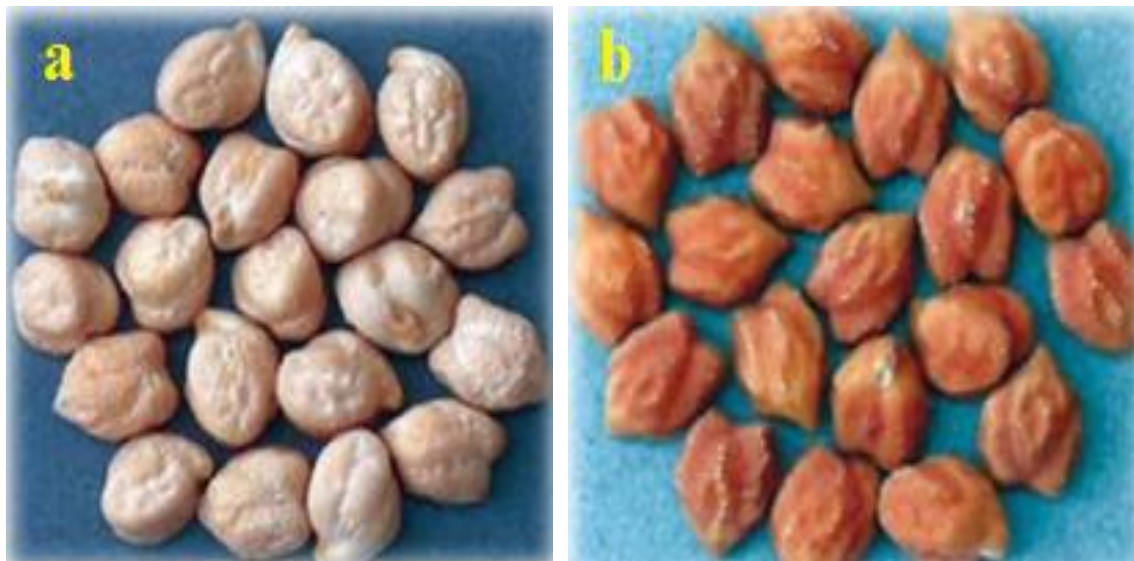


Figure 2 : Types de pois chiche (*Cicer arietinum* L.). (Gaur et al., 2010)
Kabuli (a) et Desi (b)

Le système racinaire mixte, dont la croissance s'arrête au démarrage de la floraison, permet à la plante d'explorer un grand volume de sol et lui confère une tolérance à la sécheresse (Slama, 1998). Il est composé d'une racine principale pivotante qui peut atteindre 1m de profondeur et des racines secondaires traçantes. La profondeur dépend des techniques culturales, de l'état du système racinaire et de la nature du sol. En effet, la semelle du labour peut entraver l'élongation de la racine principale.

Les nodules, développés sur les racines permettent la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique pour satisfaire 80% des besoins de la plante en azote assimilable. Cette fixation symbiotique est à son optimum à la floraison et chute très rapidement par la suite (Slama, 1998).

Les feuilles ont la forme imparipennée et sont composées de 7 à 15 folioles ovales et dentelées (Fig.3), sans vrilles, en position alternée sur un rachis. Les faces inférieures des feuilles sont couvertes par un duvet formé de poils unis et pluricellulaires. Ces poils renferment des glandes qui synthétisent des acides organiques tels que l'acide oxalique (Slama, 1998). Comme pour les feuilles, la tige est couverte par des poils unis et pluricellulaires. Selon les génotypes de pois chiche, à une certaine hauteur, la tige se ramifie en deux ou trois branches pour donner des ramifications secondaires et par la suite des ramifications tertiaires.



Figure 3 : Morphologie de *Cicer arietinum* L. (Le Driant, 2011)

1 : Fleur ; 2 : feuille composée de folioles ; 3 : graine germée ; 4 : gousse ; 5 : racines

Les fleurs sont zygomorphes, articulées, solitaires ou en grappes de deux fleurs insérées sur des pédoncules axillaires à l'aisselle des feuilles et au niveau des bifurcations. Le pois chiche est une espèce autogame (Ladizinsky, 1987) caractérisée par une floraison massive.

Seulement son taux de nouaison est faible et varie de 28 à 37% respectivement chez les types Kabuli et Desi. L'apparition des premières fleurs dépend de plusieurs facteurs tels que la précocité de la variété, la date et la densité du semis et des techniques culturales. La floraison est rapide durant les jours longs et lente durant les jours courts, selon les génotypes elle est de 30 à 45 jours. Toutefois, comme le pois chiche est une espèce à croissance indéterminée, sous des conditions hydriques favorables et des températures clémentes, les branches continuent à se développer, à fleurir et à produire des gousses et des graines (Fig.4) (Berger et *al.*, 2006 ; Ben Mbarek, 2011).



Figure 4 : Différents organes de *Cicer arietinum* L . (Ben barek, 2011).
a. Branches avec des gousses vertes, **b.** Fleurs blanche, **c.** Fleurs rose.

Les gousses sont ovales et réniformes, contiennent en général 1 à 2 graines (Fig.5), parfois 3 graines. Elles n'éclatent pas à la maturité. Les graines sont plus ou moins rondes, pourvues d'un bec, leur taille et leur aspect varient selon les variétés, tout comme leur couleur: blanche, jaune et noire (Soltani et *al.*, 2006)



Figure 5: Gousses et graines de *Cicer arietinum* L. (ILC 482) (Soltani et al., 2006).

1.3.3. Les espèces de pois chiche

Le genre *Cicer* comprend un grand nombre d'espèces. Afin de trouver des liens parentaux entre les espèces annuelles sauvages et cultivées du genre *Cicer*, Ladizinsky et Alder (1975) ont effectué des croisements interspécifiques entre les trois espèces sauvages *C. judaicum* Boiss. , *C. pinnatifidum* Jaub et Spach et *C. bijucum* Rech. et l'espèce cultivée *C. arietinum* L. Les hybrides ainsi obtenus ne sont pas viables.

Van-Der Maessen (1979) a décrit les espèces du genre *Cicer* et les a répartir en trois groupes:

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

1.4. Cycle de culture et exigences édapho-climatiques

1.4.1. Cycle et saison du pois chiche

Dans le bassin méditerranéen, le pois chiche est considérée comme une culture de printemps, la plante se développe vigoureusement et complète son cycle évolutif en 4 mois (El-Aoufir, 2001). La pollinisation chez le pois chiche est complétée pendant le stade de

formation des bourgeons à fleur, avant qu'elles ne soient visitées par les abeilles dans les champs (Van Der Maesen, 1972). Certains cultivars de pois chiche à maturité précoce peuvent compléter leur cycle de vie dans 65 jours. Cependant les cultivars à maturité tardée demandent environ 120 jours. Les variétés du pois chiche en hiver peuvent étaler leurs cycles végétatifs jusqu'à 180 jours (Muehlbaur et Rajesh, 2008) (Fig.6).

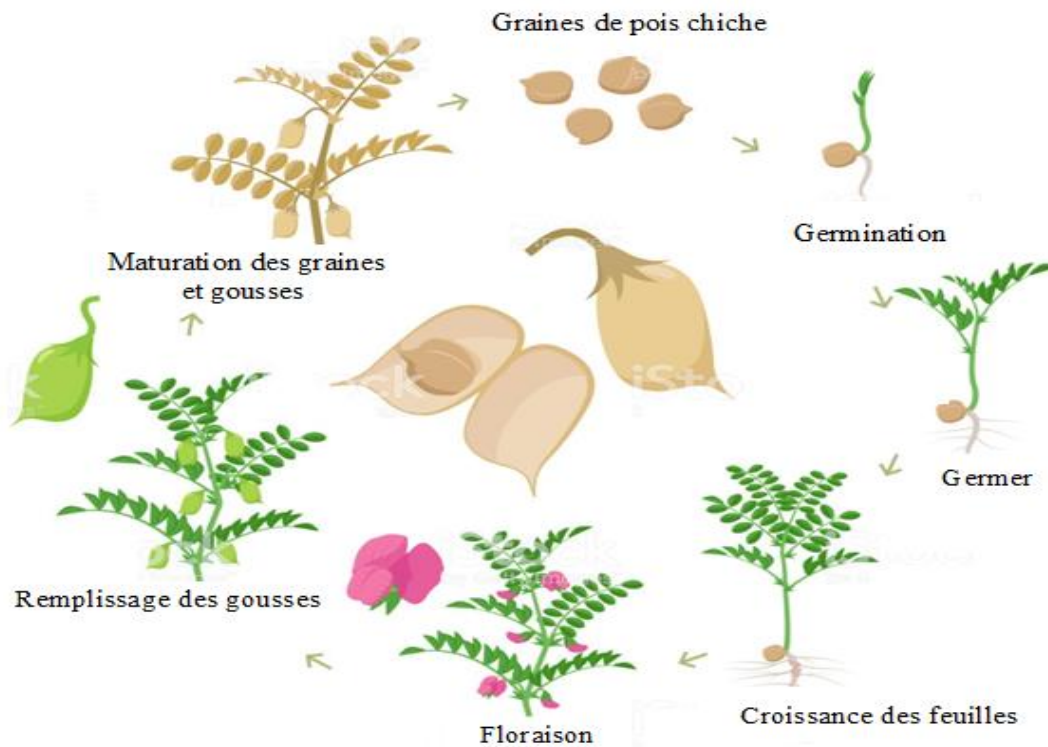


Figure 6 : Cycle de culture de pois chiche (Muehlbaur et Rajesh, 2008)

1.4.2. Exigences édaphi-climatiques de la culture

Le pois chiche est peu exigeant en qualité du sol. A l'origine, les premiers écotypes ont été collectés à partir des sols marginaux, rocheux, à texture grossière et des sols profonds à texture fine dont le pH est neutre ou alcalin, variant de 7,3 à 8,2 (Berger et *al*, 2003). Néanmoins, il est adapté aux sols bruns et bruns foncés (Jaiswal et Singh, 2001).

Une température ambiante variant de 20 à 30 °C le jour et de l'ordre de 20 °C la nuit, assure un bon développement végétatif du pois chiche. Le pois chiche du type Kabuli craint les gels et il est facilement infecté par les champignons telluriques. Au moment du semis, la température du sol doit être supérieure à 10 °C. En fait, un sol relativement chaud permet une

réduction de l'exposition des semences aux maladies, une germination des graines et une émergence des plants rapides (Jaiswal et Singh, 2001).

Par comparaison aux autres espèces de la tribu des viciées, grâce à son système racinaire profond, le pois chiche est doté d'une certaine rusticité et d'une tolérance à la sécheresse (Verghis *et al.*, 1999). D'après Wery, (1990), une consommation en eau de 100 à 150 mm confirme que le pois chiche est doté de bonnes capacités pour extraire l'eau stockée dans le sol. Néanmoins, quelque soit le type de culture, de printemps ou d'hiver, et le type de pois chiche, Dési ou Kabuli, la phase critique pour les besoins en eau est entre les phases phénologiques fin floraison et stade laiteux (Verghis *et al.*, 1999).

Slama (1998) a énoncé que le pois chiche craint le stress hydrique durant les stades de floraison et de remplissage des graines. Allen *et al.* (1998) ont délimité le cycle cultural du pois chiche de printemps à 95 jours et l'ont réparti en quatre phases phénologiques (Tab. 2).

Saxena, (1990) a rapporté que dans les régions du bassin méditerranéen, où la pluviométrie moyenne varie de 273 à 736 mm/an, le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est conduit en culture pluviale. D'après Saxena (1985), les géotypes de pois chiche, du type Kabuli, sont, généralement, cultivés dans les régions où les précipitations moyennes sont supérieures à 400 mm/an. Saxena (1987) a remarqué que le pois chiche peut être conduit sous des conditions pluviales caractérisées par de grandes variations dans le temps, inter et intra annuelles, et dans l'espace, en quantités, en fréquence et en durée. Le même auteur a remarqué que la consommation en eau du pois chiche dépend de l'humidité dans le sol. Il a rapporté qu'il y a une corrélation positive et hautement significative entre la dose d'eau d'irrigation administrée et le rendement en graines escompté. En fait, avec une dose d'irrigation qui varie de 110 à 240 mm, le rendement en graines varie de 0,9 à 3 t/ha. Pour une culture de pois chiche de printemps, les besoins hydriques sont de 297 mm dans les zones arides et de 413 mm dans les zones humides sont respectivement de 311 et 432 mm (Saxena, 1987).

Tableau 2 : Durées des stades de développement phénologiques d'une culture de pois chiche de printemps (Allen et *al.*, 1998).

Phase	Stades phénologiques	Durées (en jours)
I	Initial	20
II	Développement	25
III	Croissance	35
IV	Maturité	25

1.5. Importance économique du pois chiche

1.5.1. Dans le monde

En 2021-2022, selon les estimations, la production de pois chiche devrait avoir nettement diminué pour atteindre 64 Kt, en raison des superficies réduites et des mauvais rendements. Toutefois, l'offre devrait diminuer seulement de 23 % pour atteindre 389 Kt, en raison des stocks d'ouverture plus élevés. Les exportations devraient rester stables, et les principaux débouchés d'exportation des pois chiches canadiens devraient demeurer l'Union européenne, les États-Unis et le Pakistan. Les stocks de fermeture devraient diminuer de 45 %, ce qui aura un effet favorable sur les prix. Le prix moyen devrait augmenter de 54 %, compte tenu de la baisse prévue de l'offre mondiale.

Selon les estimations de l'USDA, la superficie ensemencée en pois chiches serait de 0,38 million d'acres, en hausse de 39 % par rapport à 2020-2021. Compte tenu des rendements inférieurs à la normale et d'un taux d'abandon plus bas, l'USDA prévoit que la production américaine de pois chiches s'établira à 138 Kt, en baisse de 29 % par rapport à 2020-2021(Fig.7).

L'Inde est le premier producteur mondial de pois chiches avec 80.2 % de la production annuelle (Fig.8). L'Afrique contribue avec 6% de la production annuelle, l'Éthiopie est arrivée le premier producteur du continent (AAC, 2020). Les autres principaux producteurs de pois chiches au monde sont le Pakistan, la Turquie, le Mexique, le Canada et l'Australie (FAO, 2019).

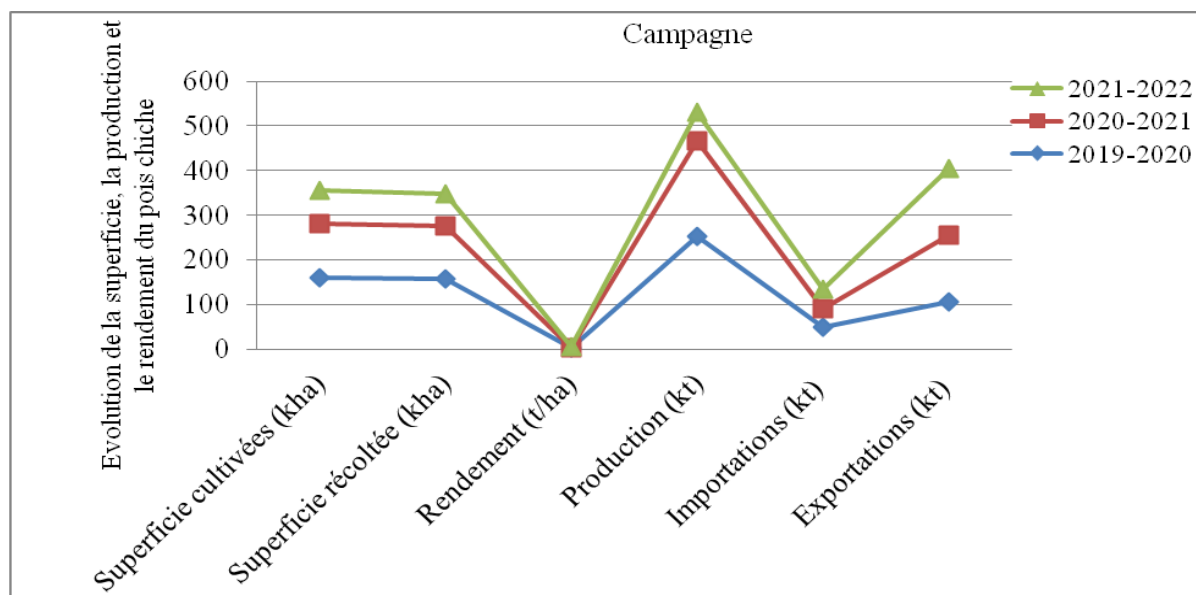


Figure 7 : Evolution de la production, de la superficie et de rendement de pois chiche dans le monde (AAC, 20 Octobre 2021).

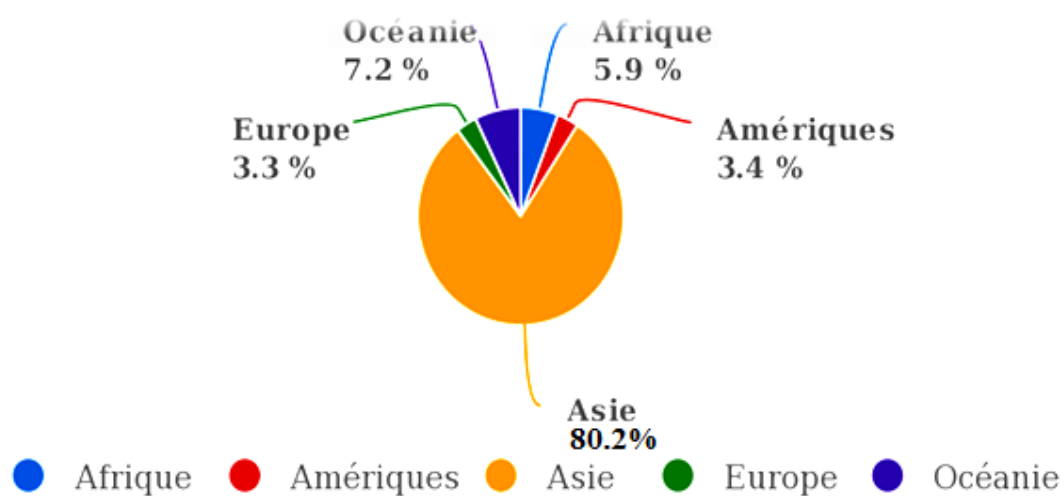


Figure 8 : Pourcentage de production du pois chiche par continent en 2019 (AAC, 2020).

1.5.2. En Algérie

En Algérie, le pois chiche constitue la seconde légumineuse cultivée après la fève (*Vicia faba* L.) (Abdelguerfi et *al.*, 2001). La culture du pois chiche occupe une superficie moyenne de 27 000 ha, pour une production nationale qui oscille entre 17800 et 35000 tonnes par an (Fig.9) (DSASI, MADR, 2017). L'Algérie est contrainte d'importer annuellement des quantités importantes de pois chiche pour faire face aux besoins sans cesse croissants. L'accroissement des superficies et l'amélioration des rendements permettront une diminution de ces importations. L'introduction de cette culture dans la rotation permettra aux agriculteurs d'augmenter leurs revenus par la diminution des superficies en jachère, notamment dans les zones potentielles où la pluviométrie annuelle est située entre 450 et 600 mm, ainsi qu'une économie dans les amendements en engrais azotés utilisés dans la culture des céréales (ITGC, 2018). Les rendements sont très variables d'une décennie à l'autre. Ils varient en moyenne de 3 à 7 qx/ ha (Zine-Zikara et *al.*, 2015).

Cette production est très insuffisante et incapable de couvrir la demande nationale, la sécheresse, les faibles précipitations, la salinité et les maladies sont les plus importants facteurs qui affectent la production agricole (Maatougui et *al.*, 1996). Ces dernières décennies, la surface cultivée en pois chiche a diminué malgré le prix rémunérateur encourageant appliqué par les coopératives, 3000 DA/ quintal presque équivalent à celui du blé tendre, 3500 DA/quintal (Agence Nationale de Développement de l'Investissement). L'importation du pois chiche est inévitable pour garantir sa disponibilité sur le marché intérieur malgré la hausse des prix sur le marché. Le rapport du CIHEAM (Centre International des Hautes Cultures Méditerranéennes) parut en 2008, montre que la production nationale de pois chiche durant la décennie 1995-2005 couvrait seulement 27,7 % de la demande (Benabdeli et *al.*, 2010). L'Algérie importe chaque année, en moyenne, plus de 38 millions dollars en pois chiche (Faostat, 2016) soit, 6.6 % des importations (Dusunceli et *al.*, 2007).

En 2021, la culture de pois chiche en Algérie occupe une superficie de 36 206 ha et une production de 403 699 qx avec un rendement moyen de 11,2 qx/ha (MADR-DSASI, 2021).

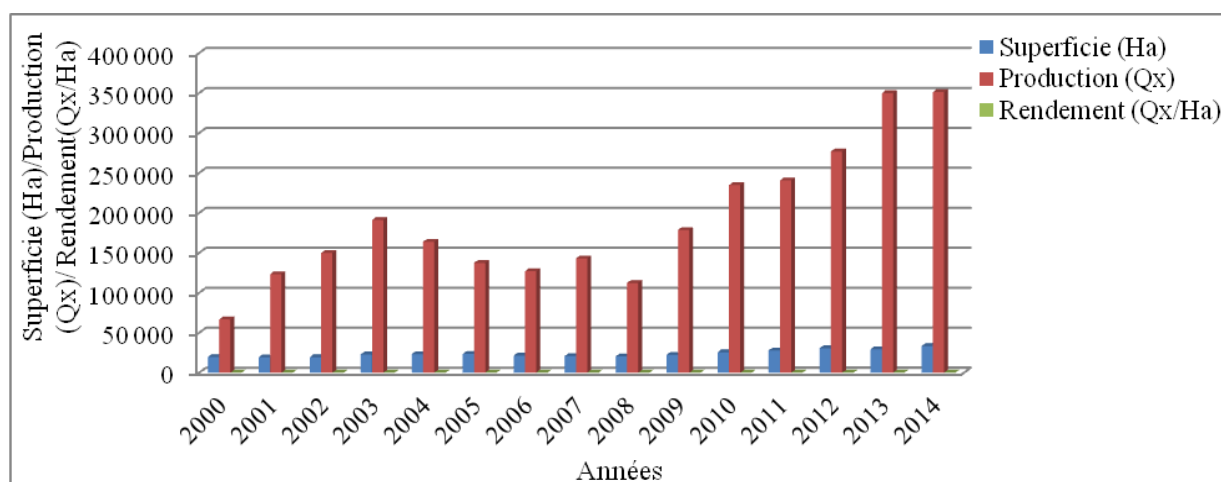


Figure 9: Évolution de la culture du pois chiche en Algérie (MADR, 2017 ; ITGC 2018).

Les zones favorables à la culture du pois chiche se situent essentiellement à l'Ouest au niveau des plaines de Maghnia, Ain Témouchent, Sidi Bel Abbès, la plaine de Ghris, et le bas Chéliff, ainsi qu'au niveau des Hauts Plateaux de Saida et de Tiaret. A l'Est, au niveau des Hauts Plateaux de Bordj Bou Arreridj, d'Oum El Bouaghi (Plateaux de Ain M'Lila, Ain Fekroun, Oum El Bouaghi et Ain El Beida), ainsi que le Nord de Tébessa (ITGC, 2018).

Le pois chiche de printemps est cultivé dans le Nord-Ouest, le Centre et le Nord-Est du pays, alors que le pois chiche d'hiver est cultivé dans les Hauts Plateaux de l'Est, Centre et Ouest (Fig.10) (Zine-Zikara et *al.*, 2015).

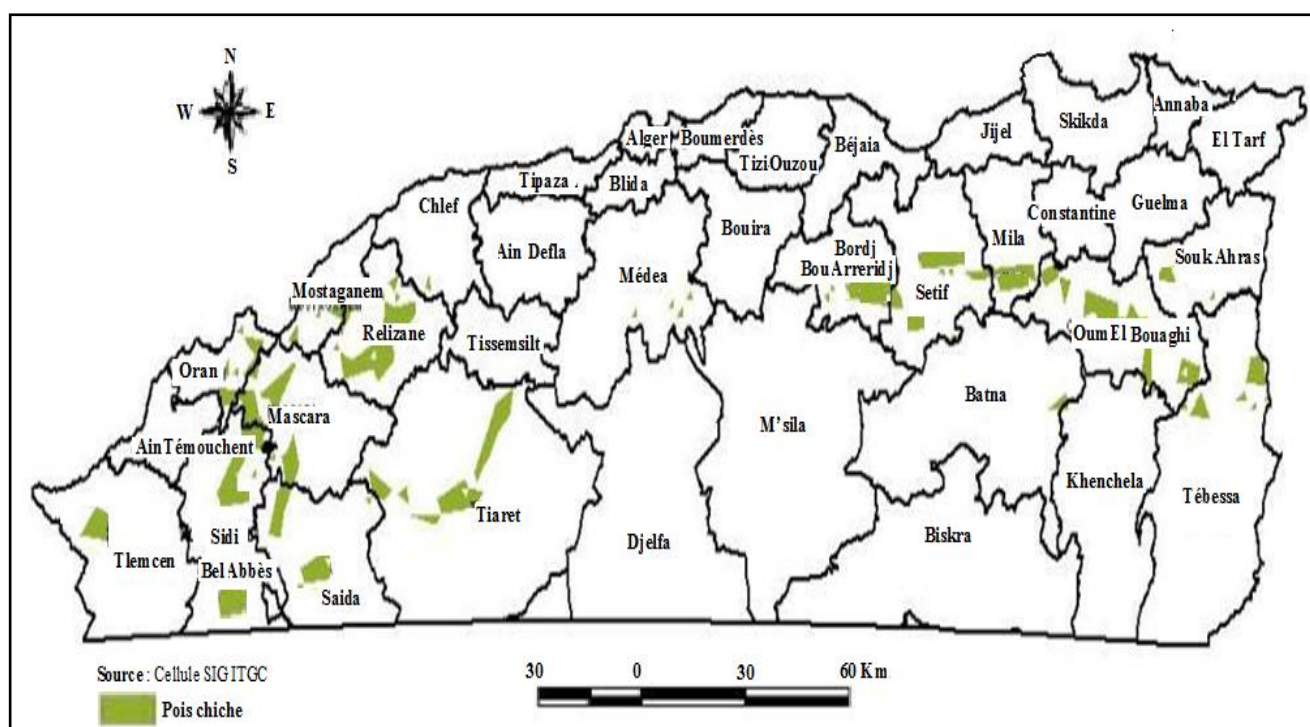


Figure 10: Zones d'aptitude de la culture du pois chiche en Algérie (ITGC, 2018)

1.6. Principales variétés de pois chiche cultivées en Algérie

L'utilisation de semences règlementaires est le facteur de production le plus facilement transférable en milieu producteur. Dans le cas des variétés de pois chiche, le choix doit être orienté selon l'adaptation aux conditions agro-écologiques, la qualité culinaire recherchée et le potentiel productif de la variété. Le tableau 3 présente quelques caractéristiques des variétés cultivées en Algérie

Tableau 3: Caractéristiques des principales variétés de pois chiche cultivées en Algérie

	Variétés	Types	Caractéristiques
Variétés locales	Ain Témouchent Sebdou Rabat 9	Kabuli	Port étalé, semi -précoce, sensible à l'anthracnose et au flétrissement, faible productivité, à semer au printemps, bonne valeur culinaire
	Chetoui 1 (ILC 3279)	Gulabi	Port très érigé, hauteur élevée, tardive, tolérante à l'anthracnose, au flétrissement, bonne productivité, à semer en hiver, valeur culinaire assez bonne
	Beni Chograne (Flip 84-92c) Seraidi (Flip 90-13 C)	Kabuli	Port semi-érigé, semi-tardive, tolérante à l'anthracnose, à semer en hiver
Variétés en multiplication	Oued Rhumel (Ghab 04), Ain Zada (Ghab 05)	Kabuli	Port érigé, semi –tardive, tolérante à l'anthracnose, à semer en hiver
Variétés nouvellement introduites	Souagui, Makerra, Béni Aziz, Béni Hamiden, El Ogbane, Tafna, Tikjda		

1.7. Importants problèmes phytosanitaires du pois chiche en Algérie

Le pois chiche peut être attaqué par de nombreux parasites. Cependant, tous ne sévissent pas en Algérie et tous n'ont pas le même impact sur la culture. La culture de pois chiche subit plusieurs maladies graves qui l'attaquent à tous les stades de développement. Dans plusieurs pays, la production du pois chiche est limitée par l'action de plusieurs facteurs de stress dont les plus importants restent les maladies causées par une large gamme d'organismes phytopathogènes comprenant des champignons (Tab.4), des virus (Nene *et al.*, 1991) (Tab.5) et des bactéries telles que *Xanthomonas campestris* pv. *Cassiae* (Shroeder., 2011) (Tab.6).

Tableau 4: Les principales maladies fongiques les plus importantes du pois chiche (in Tlemsani, 2010)

Maladies	Agents responsables	Références
Anthracnose	<i>Ascochyta rabiei</i> (Pass.) Labr	(Merzoug et al., 2009 ; Chérif et al., 2007 ; Mazur et al., 2004 ; Singh et al., 1998 ; Singh et al., 1994 ; Susanne et Wolfgang, 1990 ; Singh, 1990 ; Haware et al., 1986).
Pourriture sèche	<i>Rhizoctonia sp.</i>	(Merzoug et al., 2009; Mazur et al., 2004 ; Rouibah , 1989 ; Trapero-Casas et Jimenez- Diaz, 1985 ; Singh et Mehrotra, 1980).
Pourriture noire	<i>Fusarium oxysporum f.sp.Pisi</i>	(Merzoug et al., 2009 ; Mazur et al., 2004 ; Rouibah , 1989 ; Trapero-Casas et Jimenez- Diaz, 1985).
Flétrissement vasculaire	<i>Fusarium oxysporum f.sp.Ciceri</i>	(Merzoug et al., 2009 ; Chérif et al., 2007 ; Mazur et al., 2004 ; Singh et al., 1998 ; Singh et al., 1994 ; Trapero-Casas et Jimenez- Diaz, 1985 ; Mani et Sethi, 1984).
Pourriture racinaire noire	<i>Fusarium solani</i> (Mart) Sacc.	(Merzoug et al., 2009 ; Mazur et al., 2004 ; Trapero-Casas et Jimenez- Diaz, 1985 ; Mani et Sethi, 1984).
Pourriture du collet	<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.	(Chérif et al., 2007).
Fonte de semi	<i>Pytium debaryanum</i> Hesse, <i>Pytium irregulare</i> Buisman, <i>Pytium ultimum</i> Trow	(Kaiser et Hannan, 1983 ; Trapero Casas et al ., 1990).
Pourriture racinaire	<i>F.acuminatum</i> , <i>F. arthrosporioides</i> , <i>F. avenaceu</i> , <i>F.solani.f.sp.Eumartii</i> .	(Merzoug et al., 2009).
Complexe du flétrissement	<i>F.oxysporum f.sp.Ciceri</i> , <i>F.solani</i> , <i>Verticilium albo-atrum</i> , <i>Rhizoctonia bataticola</i> et <i>R.solani</i> .	(Fahim et al., 1987 ; Trapero-Casas et Jimenez- Diaz, 1985 ; Grewal, 1982).

Tableau 5: Principales maladies virales affectant le pois chiche (Nene et *al.*, (2012) ; Schwinghamer et Larsen (2011).

Symptômes	Agent causal	Références
Décoloration et déformation des plantes	<i>Pea Leaf Roll Virus</i> (PLRV)	(Nene et Reddy, 1987)
Nanisme des plantes	<i>Bean Leaf Roll Virus</i> (BLRV)	(Trapero- casas, 1999)
Mosaïques	<i>Bean Yellow Mosaic Virus</i> (BYMV)	(Trapero- casas, 1999)

Tableau 6: Principales maladies bactériennes affectant le pois chiche (Shroeder, 2011).

Symptômes	Agent causal	Références
Pourriture de la plante	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Cassiae</i> (Kulkarni, Patel & Dhande) Dye.	ICARDA, 1985
	.	

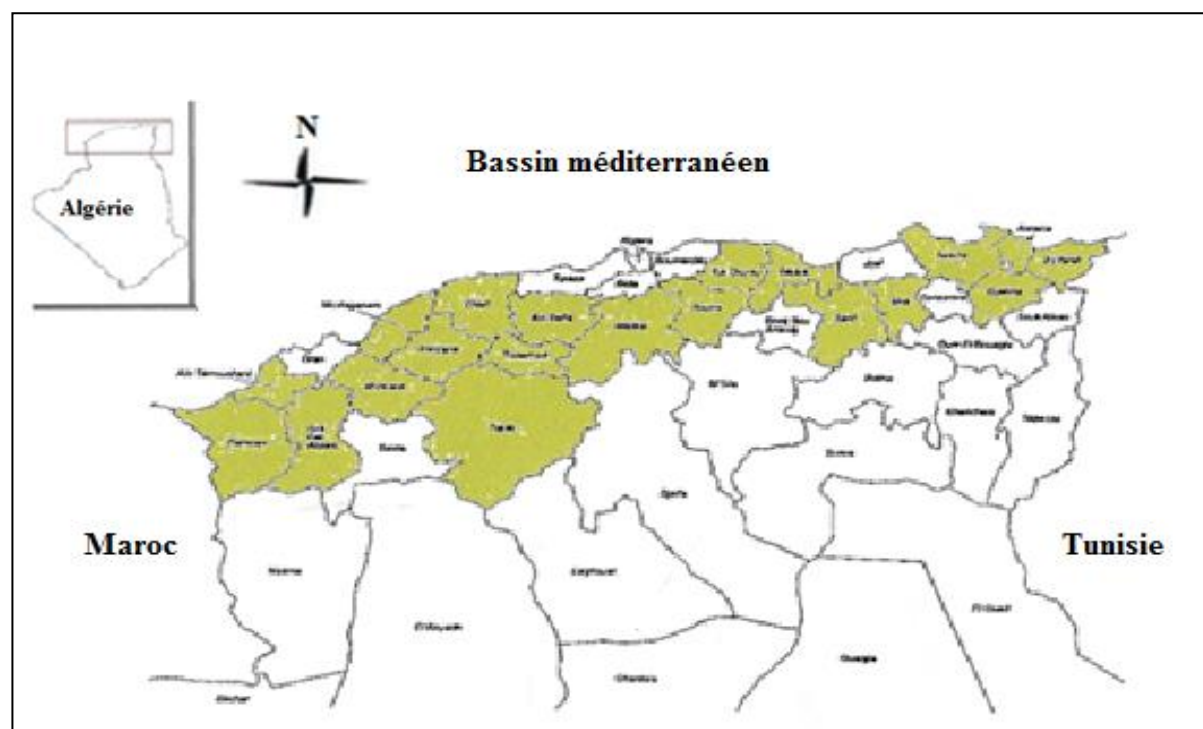
Chapitre II : L'antracnose du pois chiche : *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.

L'antracnose du pois chiche causée par *Ascochyta rabiei* a été décrite par Labrousse (1930) cité par Chahid et al. (2008) comme *Phyllactinia rabiei* parce qu'il a observé les spores non bicellulaires sur l'hôte. En 1931, il a proposé la dénomination de *Ascochyta rabiei* car il a constaté que le champignon produisait 2-4% de spores bicellulaires sur des plantes inoculées artificiellement. Ainsi, la maladie a été décrite pour la première fois en 1911 par Butler dans le Nord Ouest de l'Inde (Butler, 1918 in Chahid et al., 2008). Le pathogène *A. rabiei* peut affecter les espèces apparentées spontanées du genre de pois chiche *Cicer* (Millan et al., 2003; Hernandez-Bello et al., 2006). Les agents d'antracnoses provoquent généralement des dégâts importants dans toutes les zones de production des protéagineux. La distribution des antracnoses du pois chiche recouvre les principales aires de production de la culture (Tivoli et al., 1998). Au Maroc, pratiquement tous les parasites responsables d'antracnoses sur les principales espèces de légumineuses ont été observés; la maladie est qualifiée de contrainte biotique majeure sur certaines cultures (Mabssoute et al., 1996). Les rendements au Maroc n'ont été que de 0,2 qx / ha en 1970 et 1971 ; alors qu'en 1973-1974 où la maladie n'a pas été signalée, la production moyenne était passée à 10,3 qx /ha (Tab.7) (Pieters et Tahiri, 1986). Dans le Sud de l'Europe, l'antracnose du pois chiche est considérée comme la maladie la plus importante des légumineuses à gros grains (Porta-puglia, 1990).

Maatougui et al. (1996) ont rapporté l'existence de l'antracnose dans toutes les zones de production en Algérie (Fig.11). Les pertes occasionnées par cette maladie pouvant atteindre jusqu'à 100% (Zaâtri, Djellali, 1988). La plupart des agents d'antracnoses présentent sur l'ensemble des légumineuses à grosses graines : Pois, Pois chiche et Fève (Bouznad et al, 1996)

Tableau 7: Les pertes quantitatives causées par *Ascochyta rabiei* dans certains pays (Nene et Sheila, 1992).

Pays	Années	Pertes en %	Références
Pakistan	1920-1930 1979-1980	50% (1 million roupies par an) 48% de rendement	Malik et Tufail, 1981
Ex-USSR	1956	100% de rendement	ICARDA, 1983
Tunisie	1981	40% de rendement	ICARDA, 1983
USA	1987	1 million \$ US	
Syrie	1982	35 % de rendement	
Algérie	1988	100% de rendement	Zaâtri, Djellali, 1988



Présence de *Ascochyta rabiei*

Figure 11 : Distribution géographique de l'antracnose en Algérie (Maatougui et al.1996).

2.1 *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. : Taxonomie

L'agent pathogène *Ascochyta rabiei* appartient à la subdivision des Deuteromycotina; à la classe des Coelomycètes et à l'ordre des Sphaeropsidales (Agrios, 1988).

Classification de *Ascochyta rabiei* agent de l'antracnose du pois chiche (Mycobank, 2016)

Règne	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Sous-phylum	<i>Pezizomycotina</i>
Classe:	<i>Dothideomycetes</i>
Sous-classe	<i>Pleosporomycetidae</i>
Ordre:	<i>Pleosporales</i>
Genre	<i>Ascochyta</i>
Espèce	<i>Ascochyta rabiei</i>

La découverte du stade téléomorphe: *Didymella rabiei* (*Mycosphaerella rabiei*) a permis de l'intégrer au sein de la taxonomie des Ascomycètes ce qui engendre une double nomenclature pour cette espèce.

Division :	<i>Eumycètes</i>
Subdivision :	<i>Ascomycètes</i>
Classe :	<i>Loculoascomycètes</i>
Ordre :	<i>Dothideales</i>
Genre :	<i>Didymella</i>
Espèce :	<i>D. rabiei</i> (Agrios, 1988)

2.2. Description de *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.

Ascochyta rabiei se développe sur divers milieux artificiels (Singh, 1984; Kaiser, 1997 ; Ali et al., 2009b) et présente une variabilité phénotypique au niveau de la croissance radiale et de l'aspect des colonies (Bruns et Barz, 2001 ; Ali et al., 2009b). Elles sont plates, à croissance lente, au début blanches puis, après 3 à 4 jours, avec la formation des pycnides prennent des teintes variant entre le marron, le noir (Khan et al., 1999), le vert ou le gris (Basandrai et al., 2005). Sous l'effet de la photopériode, elles forment des secteurs cultureux ou zonations constituées de cercle foncé alternés avec d'autres plus clairs (Fig.12a). L'abondance des pycnides et du cirrhe donne à la colonie un aspect humide (Khouadjia-

Daoudi 2000) (Fig.12b). Le mycélium est septé et hyalin (Chandirasekaran, 2007) (Fig.12c). Les spores sont des conidies à 90% unicellulaires qui font 8-15µm de long sur 4-6µm de large et sont hyalines, oviformes ou allongées, cylindriques ou hélicoïdales et parfois légèrement étroites vers une extrémité mais pour la plus part, les côtés sont arrondis. A faible pourcentage les conidies peuvent être bicellulaires avec un septum excentrique (Fig.12d)

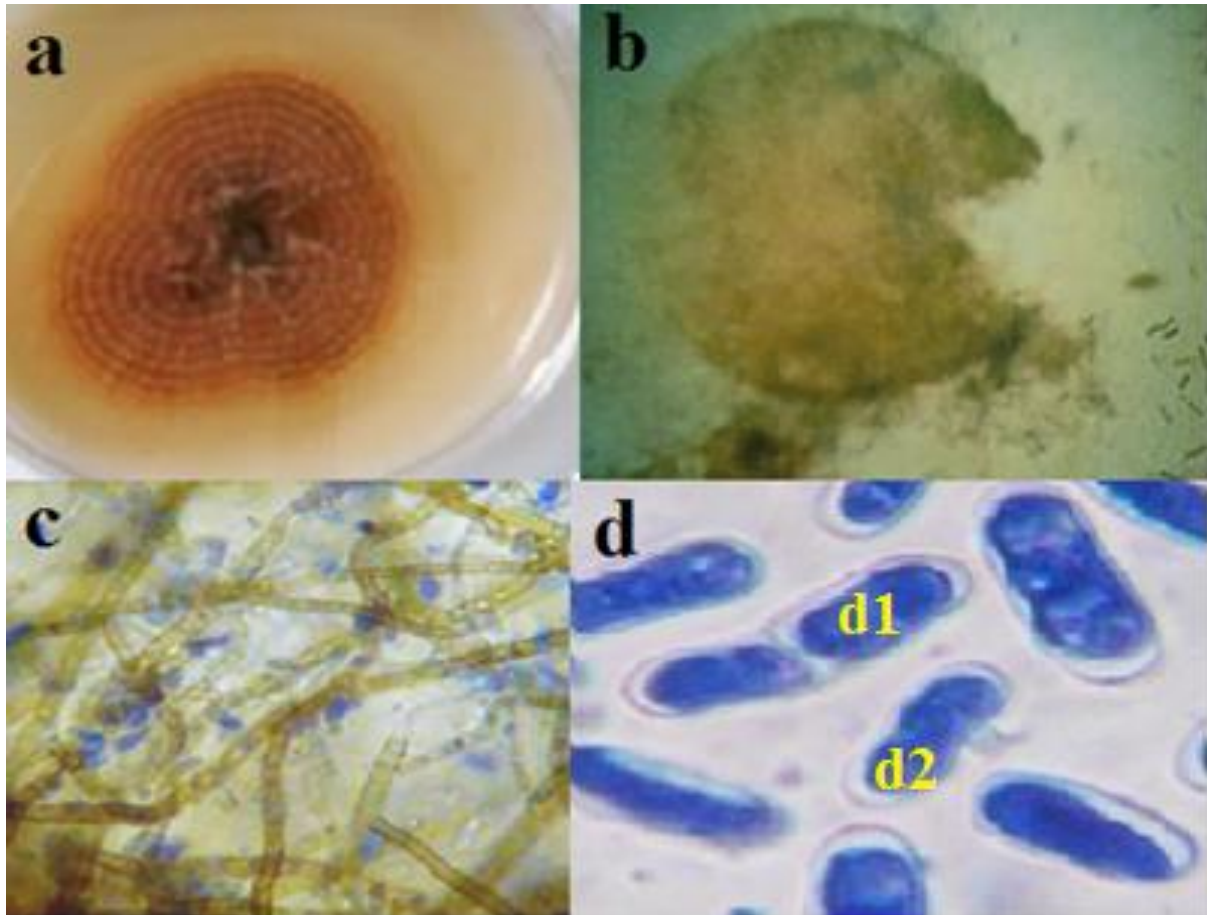


Figure 12 : Aspect macroscopique et microscopique de *A.rabiei* observés au G x100. (Harveson et *al.*, 2011).

(a) colonie sur milieu pois chiche ; (b) : pycnides agrégées ; (c) : mycélium septé ; (d) : spores : d1. bicellulaire et d2. unicellulaire.

Les organes de reproduction asexuée du stade anamorphe sont des pycnides marron à noires selon leur degré de maturité. Elles sont globuleuses à lentiformes, très agrégées, immergées dans le substrat *in vitro* et sous épidermiques dans le tissu de l'hôte (Mel'nik, 2000). Elles mesurent 100 à 260 µm sur 160 à 180 µm. Le peridium est constitué d'une à deux couches de cellules pseudo parenchymateuses isodiamétriques à paroi fine de 8 à 10µm sur 12 à 15µm (Mel'nik, 2000). A partir des cellules internes de ces pycnides se forme des

conidies ou pycnidiospores (Chandirasekaran, 2007). Elles sont hyalines de forme cylindrique, ellipsoïdale ou ovale à oblongue (Vail, 2005). Elles peuvent être incurvées à une ou aux deux extrémités (Chandirasekaran, 2007) et occasionnellement bicellulaires. Les conidies sont libérées de la pycnide à travers un pore ou ostiole saillant plus ou moins régulier d'un diamètre de 20 à 25 μm dans un cirrhe épais crème à rosâtre (Mel'nik, 2000). Des variations dans la taille des pycnides, des conidies peuvent être observées sur des substrats différents ou même des isolats différents.

Les organes de reproduction sexuée du stade teleomorphe sont des pseudothèces (Fig. 13a) de couleur marron à noir, subglobuleux, multiloculaire mesurant de 120 à 170 μm de diamètre, où se développent directement dans le stroma du mycélium, des asques bituniqués de 50 à 80 μm sur 10 à 12 μm (Fig.13b) (Bayraktar et *al.*, 2007), entourés de pseudoparaphyses ou hyphes stériles (Agrios, 2005). Chaque asque renferme huit ascospores hyalines, bicellulaires, ellipsoïdales mesurant 9,5 à 16 μm sur 4,5 à 7 μm (Fig.13b) (Bayraktar et *al.*, 2007).

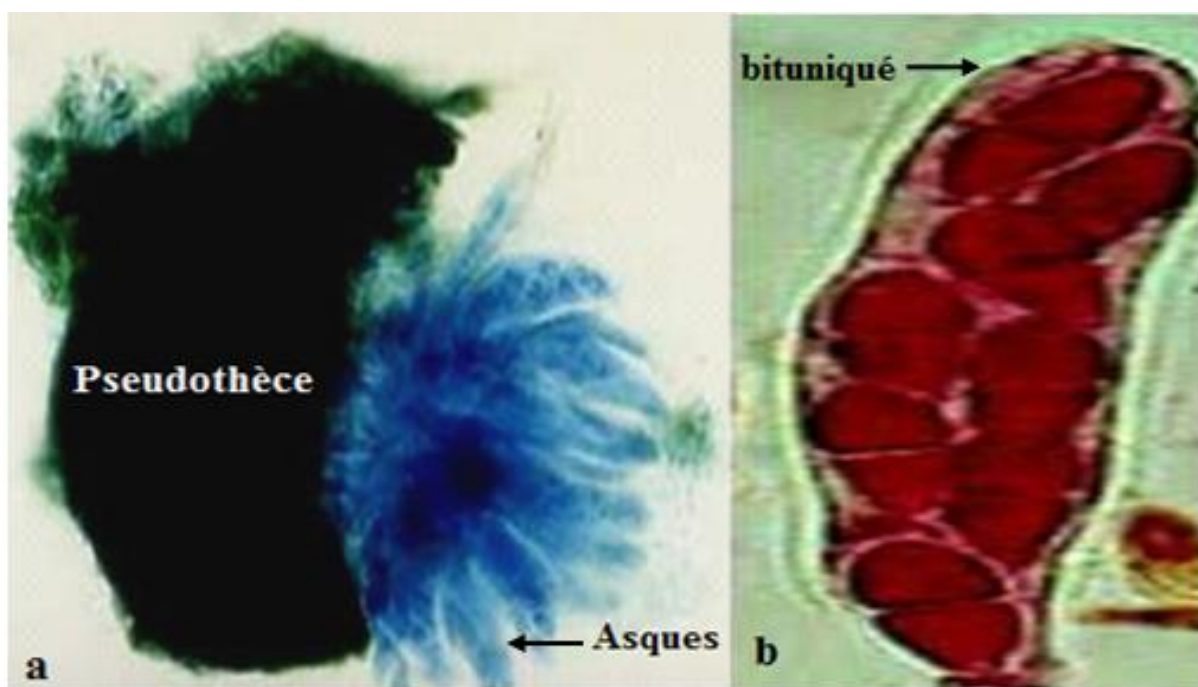


Figure 13 : Pseudothèque et asque de *Didymella rabiei* in Rhaiem et Cherif (2006)
a: pseudothèque avec asques (flèche) (x400) ; b: Asque bituniqué (flèche) avec huit ascospores bicellulaires(x 1000)

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

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

2.3. Les symptômes de l'antracnose

L'origine étymologique du terme antracnose vient du grec « anthrax », c'est une altération nécrotique des parties aériennes de la plante (Corbaz, 1991).

Le cycle des antracnoses est caractérisé par une succession de symptômes sur chacun des organes et sur les différents étages des plantes (Sharma et Ghosh, 2016). La base des plantes est généralement plus malade que l'apex. En plein champ, la maladie apparaît en premier lieu sous forme de plages où les plantes présentent une couleur jaune à marron.

Lorsque les conditions sont favorables, la taille de ces plages augmente rapidement et le champ entier peut être détruit (Sayoud et *al.*, 1999, Ilarslan et Dolar, 2002).

Plusieurs auteurs ont décrit les symptômes de l'antracnose du pois chiche (Kaiser, 1973 ; Khune et Kapoor, 1980 ; Nene, 1981 ; Weigand et *al.*, 1986 ; Nene et *al.*, 1991 ; Mabssoute et *al.*, 1996 ; Khan et *al.*, 1999 ; Akem, 1999 ; Chongo et Gossen, 2001 et Ilarslan et Dolar, 2002).

Ainsi, sur les folioles apparaissent des lésions nécrotiques marron-claires, souvent arrondies, bordées d'une marge d'un brun foncé. Ces macules sont ponctuées de points noirs appelés pycnides. Les folioles atteintes jaunissent, puis tombent

Sur les tiges, les lésions ont souvent une forme elliptique, en cas de fortes attaques, elles confluent et évoluent en une nécrose profonde entraînant la cassure de la tige et le dessèchement de la plante.

Sur les gousses se développent des lésions arrondies portant des pycnides très distinctes, disposées en cercles concentriques (Bayaa et Chen, 2011). Enfin, les grains attaqués sont souvent échaudés et ont une taille inférieure à celle des grains sains. Des tâches noirâtres bordées d'une marge irrégulière sont visibles sur leur surface. La présence des pycnides est moins visible que sur les gousses (Fig.14).



Figure14. Symptômes de l'anthracnose sur les différentes parties de plante de pois chiche (Originale, 2021).

(a) sur gousses, (b) sur tiges ; (c) sur feuilles et folioles

2.4. Biologie et épidémiologie de *A.rabiei*

2.4.1. Conservation du pathogène

Le champignon peut se conserver au niveau des semences et débris de cultures sous ses deux formes : mycélium et / ou organes de reproduction (Zachos et *al.*, 1963 ; Kaiser, 1973, Medan et *al.*, 1975 ; Nene , 1981).

En particulier, la conservation au niveau des débris constitue un moyen non négligeable de contamination des cultures de pois chiche (Reddy, 1984). Ils contribuent à conserver ce parasite en vie sous forme de pycnides et de périthèces, c'est pourquoi la culture de pois chiche ne doit pas revenir sur la même parcelle à moins de deux années d'intervalle (Zachos et *al.*, 1963).

Selon Kaiser (1972) le champignon peut survivre plus de deux années dans les semences infectées et conservées à une température dépassant 45°C.

Sattar (1933) rapporte que 50 % de spores survivent au niveau de la graine pendant 5 mois à 25°C-30°C, mais seuls 5% de spores peuvent survivre pendant 5 mois à 35°C.

Ces conditions ont été confirmées par d'autres auteurs (Zachos et *al.*, 1963 ; Gobeletz, 1956 ; Khachatryan, 1961).

En général, la température agit sur la faculté germinative. Ainsi des pycnidiospores récoltés à la surface des semences prélevées à l'intérieur des semences âgées de plus d'une année et conservées à $3 \pm 2^\circ\text{C}$, ont montré une faculté germinative qui n'atteint que 33 % (Maden et *al.*, 1975).

En absence de l'hôte, la survie de *Ascochyta rabiei* est assurée par une phase saprophytique (Nene, 1981). La capacité du champignon à vivre à l'état saprophytique a été observée par Lukashevich (1958) in Zachos et *al.* (1963) dans les résidus de culture.

2.4.2. Contamination primaire

A partir d'un inoculum conservé sous forme de mycélium et /ou organe de reproduction, les contaminations primaires peuvent intervenir à partir de trois sources : des graines contaminées, des résidus de culture et de cultures voisines contaminées (Zachos et *al.*, 1963 ; Kaiser, 1973 ; Nene, 1981).

La libération d'ascospores viables à partir de périthèces commence durant l'automne - hiver, et cesse après 8 semaines, si les tissus infectés sont maintenus à la surface du sol (Kaiser et *al.*, 1987). Les ascospores libérés, sont disséminés par le vent et constituent l'inoculum primaire pour les épidémies de l'antracnose (Trapero-casas et *al.*, 1987 ; Navas et *al.*, 1990).

Par temps sec, les pycnidiospores ne sont pas disséminés par le vent ; leur dissémination se fait beaucoup plus par contact, d'où la propagation circulaire de la maladie autour des premières plantes contaminées (Zacho et *al.*, 1963).

Haware et *al.* (1986) rapportent que le champignon commence à sporuler immédiatement après la germination des graines, permettant ainsi aux pycnidiospores d'assurer une contamination par contact des nouvelles pousses.

Les conidies produites par les pycnides s'échappent par l'ostiole pour former une masse gélatineuse appelée cirrhe.

Divers travaux ont montré que les cirrhes des champignons contiennent 60 à 80 % de spores et 20 à 40% de matières solubles, devenant visqueuses.

Ces substances solubles inhibent la germination des spores et prolongent leur conservation dans les cirrhes à l'état concentré.

Diluées par la pluie et disséminées sur les feuilles avec les spores, elles stimulent au contraire leur germination (Messiaen et *al.*, 1970).

2.4.3. Contamination secondaire

Cette processus nécessite à l'évolution des épidémies, elles sont déterminées par la durée d'incubation, la pluie et la température (Zachos et *al.*, 1963).

Leur extension a lieu par les éclaboussures des gouttelettes de pluie (Ameziane, 1985). La pluviosité joue donc un rôle dans les contaminations primaires et secondaires par la dissémination des ascospores et des conidies. Les épidémies sont favorisées par une durée d'incubation assez courte, aux températures assez élevées du printemps et aux pluies fréquentes de fin d'hiver et du commencement de la période printanière, la maladie se développe considérablement sur les cultures. Au contraire si les semis sont tardifs, les cultures recevront moins de pluie, ce qui limitera les invasions, et les dégâts seront limités ou insignifiants (Zachos et *al.*, 1963).

2.5. Exigences biologiques du pathogène

Parmi les facteurs affectant la croissance, la sporulation, le pouvoir pathogène et la survie du champignon. (Trapero – Casas et Kaiser, 1992 a) considère le rôle déterminant des éléments nutritifs, de la température, de la lumière, de l'humidité relative et de la profondeur du sol.

2.5.1.. Température

La température optimale pour l'infection et le développement de *A. rabiei* est 20 °C (Trapero – Casas et Kaiser, 1992 a ; Kimber et *al.*, 2006).

En milieu de culture, le champignon peut se développer à des températures comprises entre 10 et 27°C, mais la température la plus favorable se situe à 25°C (Kimber et *al.*, 2006). Maden et *al.* (1975) ; Kaiser (1973) rapportent que la production de pycnides et la germination des spores se situe entre 20 et 25°C ;

Comme pour beaucoup de champignons, le développement *in vitro* de la forme parfaite est grandement influencé par le facteur température. Selon les travaux de Trapero-casas et Kaiser (1987), les périthèces sont initiés à la température de 5 à 25°C, cependant la maturité n'est atteinte qu'au bout de 50 jours sous une fourchette de température comprise entre 5 et 10 °C, seuls quelques périthèces arrivent à maturité et la majorité reste stérile . Enfin à 20°C-25°C, les périthèces restent en phase de développement initial.

Quant aux ascospores, plus de 70 % sont libérées à partir de périthèces mûrs dès les deux premières heures après un mouillage des tissus infectés aux températures comprises entre 15°C et 25°C. Par contre à 5°C et 10°C, la libération des ascospores est retardée, entraînant une réduction du nombre d'ascospores libérés.

2.5.2. Durée d'humectation foliaire (Leaf Wetness Period) (LWP)

La sévérité de la maladie est augmentée avec l'augmentation de la durée d'humectation foliaire (LWP) qui réduit par un temps sec allant jusqu'à 6h (Armstrong et *al.*, 2004). La durée d'humectation augmente la faculté germinative, la pénétration du tube germinatif augmente de 2% avec 6h de la durée d'humectation et 11% avec 24h de LWP. La durée d'humectation pour l'apparition de symptômes est comprise entre 4 à 8h (Jhorar et *al.*, 1998)

2.5.3. Humidité relative

Le champignon peut survivre à des taux d'humidité relative compris entre 0-30 %, à une humidité plus forte (65 -100 %), le champignon se développe rapidement (Kaiser, 1973).

Weltzien et Kaack (1984), indiquent qu'une durée d'humidité minimale de 6 heures et une température minimale de 6°C permettent une infection effective. Ainsi Luthra et *al.* (1935) ; Kovachevski (1936) ; Zachos et *al.* (1936), Weltzien et *al.* (1984) ; Nene et *al.* (1987), rapportent que les températures inférieures à 6-10 °C et supérieures à 30 °C, limitent l'infection et le développement de la maladie.

2.5.4. Lumière

La lumière affecte également le développement du champignon, de même l'induction de *Ascochyta rabiei* dépend de l'intensité et de la qualité de la lumière. Ainsi Kaiser (1972) a obtenu une meilleure croissance et sporulation du champignon sous un éclairage continu et une exposition des cultures à des longueurs d'onde voisines de l'ultra-violet ou du bleu.

2.5.5. Nutrition

Ascochyta rabiei est une espèce qui utilise préférentiellement les glucides par rapport aux acides organiques et probablement par la cellulose de paroi. Son développement parasitaire serait donc liée à l'existence de peptides et d'amidon dans les cultures, où elle s'installe (Ameziane, 1979). Selon ce même auteur, ce champignon est nécrotrophe, c'est-à-dire tue d'abord les cellules de l'hôte avant de les coloniser.

2.5.6. Le pH

Le pH joue un rôle important sur le développement de ce champignon, Les pH compris entre 5 et 6, donnent une bonne sporulation, alors que des pH très acides ou très basiques l'inhibent (Trapero – Casas et Kaiser, 1992 b).

2.5.7. Facteurs de dissémination de l'antracnose

La dispersion de ce pathogène est effectuée par le vent, la pluie et les gouttelettes d'eau (Weltzien et Kaack, 1984)

2.6. Cycle épidémique

Ce pathogène est transmis par les graines et les résidus infectés de récolte, les débris infectés sont la source de l'inoculum primaire assuré par la libération de conidies et les ascospores. Après la contamination, les spores sont propagées par le vent et la pluie sur plantes voisines (contamination secondaire), la germination et infection des spores sur les tissus végétales nécessite une durée de 24h de pluie. L'agent pathogène peut survivre plusieurs années sur les débris et semences infectées des cultures (Pande et *al.* 2010) (Fig.15).

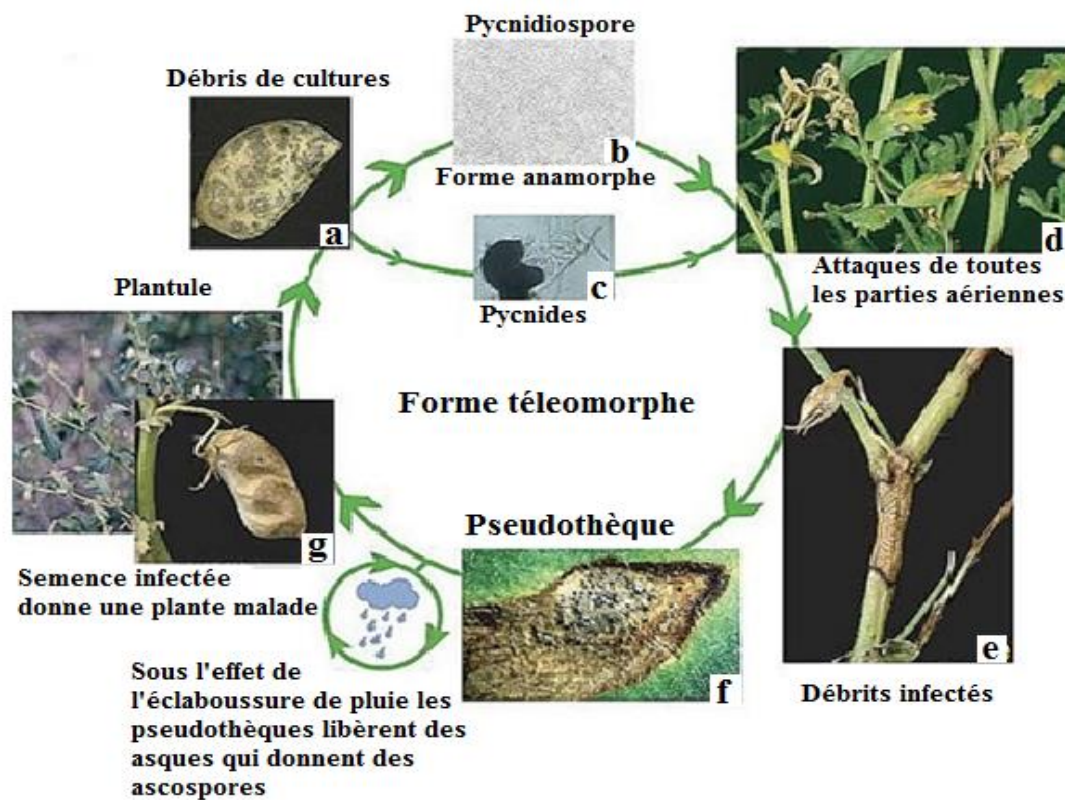


Figure15: Cycle biologique de l'anthracnose du pois chiche causé par *Ascochyta rabiei* (Pearse et *al.*, 2005).

2.7. Processus de l'infection de *A. rabiei*

La germination des conidies peuvent se produire dans une durée de 12h, lorsqu'il y a contact entre les conidies et la surface de tissu de l'hôte (Hohl et *al.*, 1990). Doukken-Bouchard et *al.* (2010) et Wiese et *al.*(1995) montrent que le tube germinatif sécrète une substance mucilagineuse pour pénétrer à la cuticule (Fig.16).

La pénétration de l'inoculum peut prendre 24h après l'inoculation par les stomates, les lenticelles et la cuticule des folioles (Pandey et *al.*, 1987; Zikara-Zine et Bouznad, 2007). Doukken- Bouchard et *al.*, 2010) montrent que *A.rabiei* forme des appressoria typiques à l'intérieur des stomates. Ces auteurs ont rapporté que *A.rabiei* sécrète les enzymes Xylanases, Exo-polygalacturanases et Cutinases qui sont responsable de l'infection.

Le champignon se propage sous l'épiderme; il provoque la destruction des cellules et plasmolyse, ces attaques entraînant la formation de zones nécrotiques et le développement de

pycnides. Les folioles, les pétioles et les tiges sont remplies et détruits par les hyphes du champignon (Kanouni et *al.*, 2011).

Les symptômes n'ont été observés que trois jours après l'inoculation (Pandey et *al.*, 1987). Le quatrième jour, les nécroses deviennent visibles. Cinq à six jours après l'inoculation, les pycnides deviennent matures et sont arrangées en cercles au niveau des tissus infectés de l'hôte. Dans le septième jour, la plupart des cellules non lignifiées sont détruites (Pandey et *al.*, 1987 ; ILarslan et Dolar, 2002).

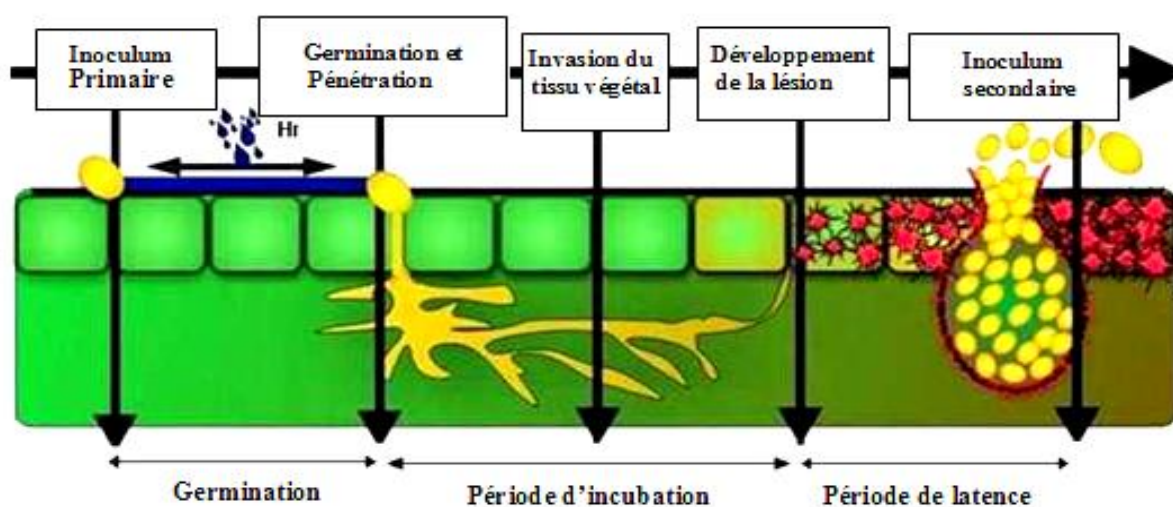


Figure 16 : Processus de l'infection de *A. rabiei* sur le pois chiche (Doukken- Bouchard et *al.*, 2010).

2.8. Pathogénicité

2.8.1. Histopathologie

Le champignon infecte la plante par pénétration directe de l'épiderme, après la formation de structures d'infection appelées appressoriums (Höhl et *al.*, 1990; Köhler et *al.*, 1995 ; Pandey et *al.*, 1987).

Après la pénétration, les hyphes se développent simultanément entre les cellules épidermiques et les cellules du parenchyme palissadique (Pande et *al.* 2005). La pénétration de la cuticule se fait par l'action des enzymes hydrolytiques (Tenhaken, 1992). Le champignon se propage sous l'épiderme, principalement dans l'espace intercellulaire, envahissant les cellules et provoquant un effondrement rapide des tissus des feuilles par plasmolyse. Les hyphes s'agrègent et forment des pycnides qui émergent à l'extérieur à partir des tissus infectés (Pande et *al.*, 2005). Au septième jour, la plupart des cellules non lignifiées sont détruites (Pandey et *al.*, 1987; Pande et *al.*, 2005 ; ILarslan et Dolar, 2002).

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

Comme de nombreux agents pathogènes, les agents d'anthraxose présentent la particularité de sécréter des phytotoxines: solanapyrones et toxine protéique qui semblent responsables de la nécrose et la mort de la cellulaire (Jayakumar *et al.*, 2005). En 1989, Alam *et al.* ont isolé pour la première fois deux solanapyrones A et B. Puis Chen et Strange (1991) identifièrent une troisième toxine appelée solanapyrone C (Fig.17). Par contre, Latif *et al.* (1993) identifièrent une quatrième toxine, la cytochalasine D (Fig.18). Ces auteurs montrent également que la quantité et la nature des toxines produites sont influencées par la composition du milieu de culture.

Selon Kaur (1995), il existerait une forte corrélation entre la production *in vitro* de solanapyrones par différents isolats et leur pathogénicité.

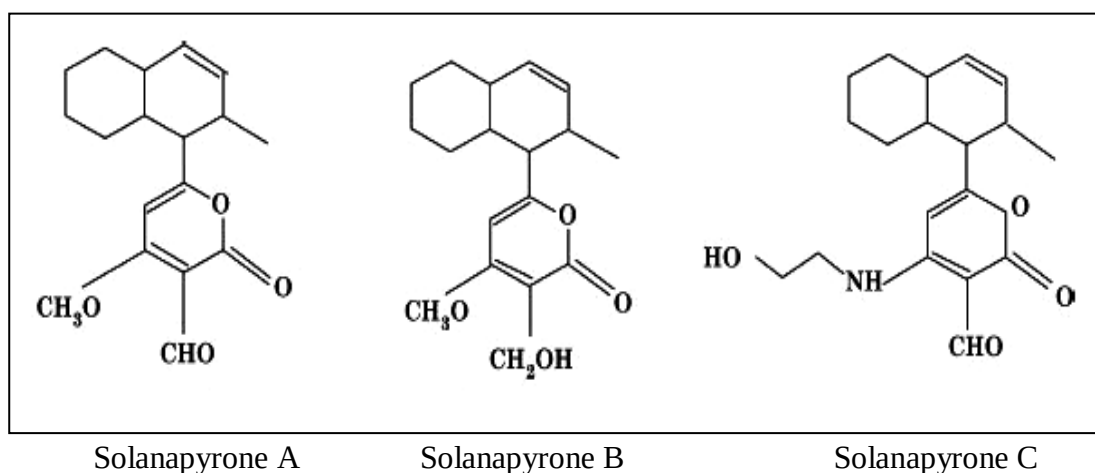


Figure 17: Structure des Solanapyrones (Bahti et Strange, 2004)

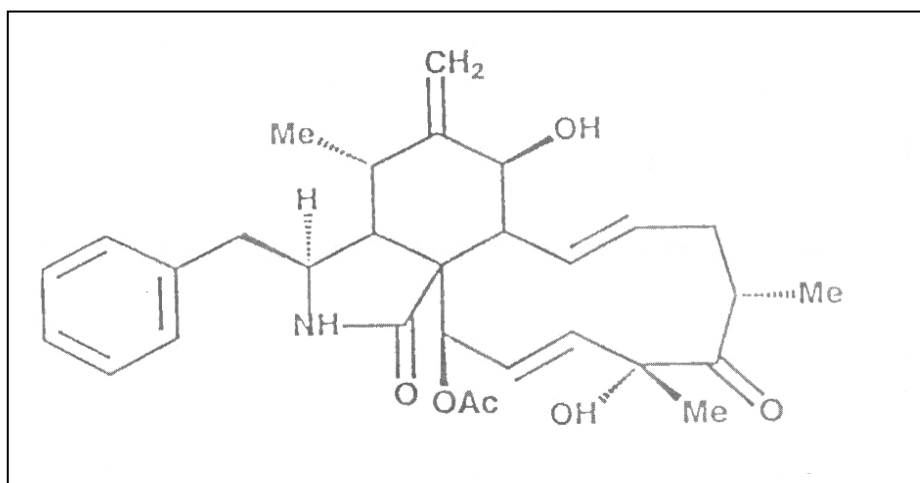


Figure 18 : Structure chimique de Cytochalasine D (Latif, 2002).

2.8.3. Variabilité du pouvoir pathogène

Généralement, les isolats de l'antracnose sont caractérisés par leur instabilité et par leur variabilité (Belabid et Fortas, 2011). Bedi et Aujla (1969) ont identifié deux races et un biotype de la race 2. En Tunisie, des isolats de *A.rabiei* ont été collectées et classées sur la base de leurs caractéristiques morphologiques en 2 catégories selon leur d'origine (Harrabi et al., 1988).

La variabilité de *A.rabiei* est liée à une variabilité de leur agressivité et de leur virulence. Porta-Puglia et al. (1996) observent différents niveaux de virulence, sur la base de la réaction de certains génotypes de pois chiche, les isolats sont réunis en trois classes. Le terme pathotype été utilisé récemment pour décrire les niveaux d'agressivité des isolats avec un petit ensemble de génotypes différentiels (Jamil et al., 2000; Chen et al., 2004). Imtiaz, 2011 confirme la présence d'un pathotype IV très agressif montre la résistance des certaines lignées.

Malgré les études et les recherches approfondies, pathologiques et moléculaires, la nature et latitude de variabilité pathogénique de *A.rabiei* n'ont pas été clairement établies (Pande et al., 2005).

2.9. Les méthodes de la caractérisation de la diversité chez les champignons phytopathogènes.

2.9.1. Les marqueurs d'expression

a. Caractères phénotypiques

Les méthodes actuelles d'évaluation de la diversité génétique en phytopathologie sont nombreuses et presque la totalité des collections est déployée au champ à l'aide de caractères phénotypiques (morphologiques, biométriques, agronomiques) soumis à la sélection (Margalé et al., 1994). Les marqueurs morphologiques sont utilisés dans la caractérisation de nombreuses espèces végétales (Chebbi et al., 1995, Mahmood et al., 2010). Les caractères morphologiques ont été longtemps utilisés pour identifier les champignons pathogènes et pour comparer des isolats de différentes origines. La caractérisation morphologiques et biométriques des champignons phytopathogènes a été l'objet de nombreuses études (Jennings et al., 1990, Edwards et al., 1999, Anikster et al., 2004, Hantula et al., 2009), qui se base générale sur l'observation microscopique de forme, de couleur ainsi que l'utilisation des outils

de mesure (analyse d'image) pour déterminer les paramètres biométriques telle que la forme, la taille et la couleur des hyphes (Andersen et *al.*, 2005). Cependant, ces caractères peuvent parfois être influencés par les conditions de l'environnement, ce qui pourrait minimiser leur porté dans une étude de diversité et de détermination de la structure de populations. Néanmoins, cette approche reste incontournable dans toute étude de diversité en phytopathologie (Sandmeier et *al.*, 1993).

b. Caractères de virulence

D'après Lourd, (1995), la virulence est considérée comme le marqueur élargi utilisé pour caractériser les champignons pathogènes (Chen et Penman, 2005). La méthode la plus simple étant l'inoculation sur une gamme d'hôtes portant différents facteurs de la résistance. Plus le nombre de gènes de résistance identifiés est important, plus le potentiel de caractérisation des facteurs de virulence est grand et plus l'analyse de la structure pathogénique de la population étudiée sera. Cependant, un des inconvénients majeurs de ce marqueur est qu'il ne peut être utilisé que dans le cas de relations hôte / parasite de type gène-pour-gène, connus et identifiés (Lourd, 1995).

2.9.2. Marqueurs iso-enzymatiques

Les isoenzymes correspondant à différentes formes d'une même enzyme, catalytique la même réaction, mais dont les propriétés physico-chimiques (charge électrique, taille, ...) sont différents. L'analyse des isozymes est une technique biochimique puissante avec de nombreuses applications, elle est utilisée depuis longtemps par les généticiens pour étudier plusieurs organismes, entre autres les agents phytopathogènes (Micales et Bonde, 1995). La technique iso-enzymatique est simple, après extraction, les protections sont déposées sur un support solide, tel que l'amidon ou le polyacrylamide, et placées dans un champ électrique. La migration conduit à séparer les molécules en fonction de leur charge et de leur taille (Lourd, 1995). Cette technique fut largement utilisée, aussi bien dans des études de taxonomie (identification des espèces des champignons que pour l'identification des pathotypes ou analyse de la structure génétique des populations. Cependant l'utilisation de ces marqueurs présente un certain nombre de limites à savoir: la faiblesse du nombre moyen d'allèles, l'occurrence de mutations silencieuses et d'allèles nuls, l'expression de certaines enzymes en fonction du stade de développement et la variabilité génétique limitée aux loci codants (Ouédraogo et *al.*, 2005).

2.9.3. Les méthodes moléculaires

Les méthodes moléculaires sont universellement applicables et permettent d'explorer le polymorphisme à différents niveaux (comparaison entre des souches, des espèces, des genres, etc.) (Verscheure *et al.*, 2002). Elles permettent d'explorer l'énorme variabilité naturelle existante au niveau de l'ADN (Xu, 2010). Ceci s'est révélé très important dans la mesure où la connaissance des relations génétiques dans une population pathogène est indispensable pour le développement de nouvelles variétés résistantes et la mise au point de stratégie de contrôle des épidémies. Il est admis que les marqueurs moléculaires qu'ils soient de type protéines ou ADN, sont indépendants de la sélection de l'hôte et permettent une étude de la biodiversité directement au niveau du génome. Cependant, les marqueurs moléculaires basés sur l'analyse de l'ADN sont actuellement préférés à ceux basés sur l'analyse des protéines lors de la caractérisation des différents champignons phytopathogènes. Il existe deux méthodes: La 1^{ère} méthode basée sur l'analyse des protéines. Elle comporte l'étude des protéines totales, des allozymes et le plus souvent l'étude des isozymes. Il existe diverses études où cette dernière approche a été utilisée pour la différenciation et la caractérisation entre les isolats, les formes spéciales ou les races de plusieurs champignons phytopathogènes (Fofana *et al.*, 1992 ; Weitz *et al.*, 1993). La 2^{ème} méthode basée sur l'analyse de l'ADN, un large spectre de méthodes rentre sous la coupole des techniques basées sur l'étude de l'ADN. Parmi les plus utilisées, Les marqueurs d'ADN sont généralement classés dans deux catégories selon les méthodes utilisées pour leurs détections: les marqueurs de type I qui sont associés à un gène connu ou à une séquence d'ADN connue ce qui sont visualisations par l'hybridation d'enzyme de restriction – digestion de l'ADN (Zhang *et al.*, 2005); les marqueurs de type RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) appartient au premier type. Les marqueurs de type II, ils sont associés aux séquences génomiques anonymes. Ces marqueurs impliquent l'amplification d'une séquence particulière ou des loci avec des amorces spécifiques ou arbitraire. La plupart des marqueurs récents sont du type II tel que RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLPs, microsatellites ou SSRs (*Simple Sequence Repeat*), ITSs et SNPs (Setti *et al.*, 2011). Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients. L'analyse de la variation génétique des populations du pathogène est une condition préalable importante pour comprendre la co-évolution des pathosystèmes des plantes (Sarwar *et al.* 2013).

a. RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou Polymorphisme de longueur de fragment de restriction

Le polymorphisme de taille des fragments de restriction implique une digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction, ceci génère plusieurs fragments. Les bandes sont alors identifiées individuellement grâce à une hybridation avec une sonde appropriée (Apuya *et al.*, 1988). C'est un Outil important dans l'identification de la diversité inter et intra-spécifique (Southern, 1979). Lors de l'étude d'un fragment d'ADN ou d'un gène particulier, la digestion enzymatique peut être précédée d'une PCR (Frisvad *et al.*, 1998), nous parlons alors de la PCR-RFPL. Cette dernière approche l'élargissement exploitée pour l'étude de plusieurs espèces fongiques; lorsqu'elle est suivie d'un séquençage des fragments générés, elle est très utile pour les investigations afférentes à la variabilité entre souches, l'évolution des populations et celle des espèces (Xu, 2010). Dans cette optique, les régions ITS (*Internal Transcribed Spacers*) sont élargissement utilisé pour la comparaison entre espèces (Nasraoui et Lepoivre, 2003), ce sont probablement les régions les plus séquencées chez les champignons actuellement. De même, les IGS (*Inter Genitic Spacer*), sont plus recommandées pour l'étude de la diversité des voitures intra-spécifiques séquences possèdent la variabilité la plus importante vérifiée au niveau de l'ADN ribosomique. Enfin, il est à noter que la PCR-RFLP peut générer d'excellents marqueurs co-dominants de grande stabilité et reproductibilité, idéal aussi bien pour les organismes haploïdes que diploïdes (Xu *et al.*, 1999). L'évaluation de la variation génétique de *A. rabiei* est basé les marqueurs moléculaires sur la technique RFLP (Tagu et Moussard, 2003). Cette technique repose sur la comparaison des profils de fragments obtenus par les enzymes de restriction suite à l'existence d'un polymorphisme dans la séquence d'une molécule d'ADN par rapport à une autre. Des mutations apparaissant sur une séquence d'ADN reconnues par une enzyme de restriction provoquent des longueurs de fragments de restriction différents. Les produits de restriction sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide ou d'agarose en présence d'un marqueur de poids moléculaire (Tagu et Moussard, 2003).

b. La RAPD (*Random Amplified Polymorphic*) ou Polymorphique amplifié aléatoire

Elle consiste en l'amplification par PCR de fragments de l'ADN génomique en utilisant des amorces arbitraires de courte taille (10 pb) (Williams *et al.*, 1990). L'analyse via cette méthode révèle deux types de variation génétique; celle de la longueur du fragment qui sépare deux sites d'hybridation de l'amorce, et la variation dans la séquence du site

d'hybridation (Xu, 2001). Cette technique est reconnue pour être simple, rapide et ne nécessite pas de connaissance préalable de la séquence. Son inconvénient majeur réside dans le fait qu'elle manque de reproductivité car elle est très sensible à la concentration en ADN et aux conditions d'amplification (Najimi *et al.*, 2003).

Elle a été utilisée afin d'évaluer le niveau de la diversité génétique entre les races de plusieurs champignons phytopathogènes (Chen *et al.*, 1993 ; Kolmer *et al.*, 1995 ; Borchardt *et al.*, 1998 ; Gonzalez *et al.*, 1998 ; Hamelin *et al.*, 1998), *Ascochyta rabiei* (Udupa *et al.*, 1998 ; Jamil *et al.*, 2010)). Elle a également été l'outil d'identification et de discrimination entre les pathotypes d'autres espèces (Kelly *et al.*, 1994; Goodwin et Annis, 1991). De même qu'elle a été largement employée pour la discrimination entre isolats de provenances diverses (Vakalounakis et Fragkiadakis, 1999; Singh, 2001; Santos *et al.* 2002; Singh et Hughes, 2006). Elle permet aussi la mise en évidence de certains marqueurs ; tel est le cas à titre d'exemple pour *Pyrenophora teres* f. *teres* chez qui un marqueur RAPD associé à une faible virulence a été identifié (Weiland *et al.*, 1999). Enfin, elle est recommandée pour le développement d'empreinte génétique utilisé comme marqueur épidémiologique (Xu, 2010).

D'après Collignon-trontin, (2000), utilise de fragments RAPD a cependant quelques limites. Les premières sont d'ordre technique, la méthode RAPD est particulièrement sensible aux conditions de réaction et de très légers changements peuvent affecter la reproductibilité des profils d'amplification obtenus. Elle doit donc être très grande standardisation, tant au niveau de la quantité d'ADN et des produits utilisés (Taq polymérase, dNTP, eau ...) est au niveau des conditions de manipulation. A ces contraintes techniques, s'ajoute une certaine incertitude dans la lecture des profils d'amplification. L'obtention de deux fragments de même taille ne signifie pas qu'ils soient homologues.

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

c. L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphic) ou Polymorphisme de longueur de fragment amplifié

Elle est fondée sur l'amplification sélective des fragments de restriction. Elle comporte trois étapes: (i) L'ADN génomique est clivé par deux enzymes de restriction, puis des adaptateurs de séquences connues et spécifiques des enzymes de restriction utilisées sont

ajoutés aux extrémités des fragments. (ii) L'amplification sélective des fragments de restriction: une première amplification, dite pré-amplification est réalisée à l'aide d'amorces de séquences complémentaires à la séquence des adaptateurs et des sites de restriction, la deuxième amplification, dite sélective, utilise des amorces identiques aux premières mais prolongées à l'extrémité 3' de 1 à trois nucléotides; ces amorces sélectives permettent de réduire le nombre de fragments amplifiés à une centaine. (iii) L'analyse des fragments amplifiés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Vos et al., 1995). Cette technique est puissante, stable et rapide, elle ne nécessite aucune connaissance préalable de séquences du génome étudié (Najimi et al., 2003). Cependant, elle doit être une très bonne qualité de l'ADN et un niveau de technicité importante. La technique AFLP s'est révélée être un outil très précieux dans les études des structures génétiques des champignons et de leur diversité. Sa grande Diffuser plus d'information sur la variabilité que toute autre technique moléculaire (Majer et al., 1996). Son application a été rapportée à titre d'exemple, sur *Septoria* (Kema et al., 2002; Schnieder et al., 1998), *Leptosphaeria* (Pongam et al., 1999), *Fusarium* (Abd-Elsalam et al., 2002) et *Pyrenophora tritici-repentis* (Leisová et al., 2008; Friesen et al., 2005).

d. Les microsatellites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou Répétition de séquence simple

Le terme microsatellite a été inventé par Litt et Luty (1989), également appelé séquences simples répétées (SSR). Ce sont des éléments d'ADN qui se répètent plusieurs fois à différentes séquences (séquences de di-, tri- ou tétra-nucléotides répétés en tandem) chez tous les organismes, à la fois les eucaryotes et les procaryotes. Les séquences répétées sont souvent simples, de taille de 1 à 6 paires de bases et ils sont présents dans les deux régions codantes et non codantes. Ces régions flanquantes tendent à être conservées à l'intérieur de l'espèce (Setti et al., 2011). Les microsatellites présentent un taux de polymorphisme élevé, qui repose sur la variation du nombre d'unités de répétition constituant ces derniers (Najimi et al., 2003). Les polymorphismes sont identifiés en construisant des amorces PCR dans la région microsatellite adjacente de la région (Hajeer et al., 2000). C'est la paire d'amorces spécifique des bordures droite et gauche du microsatellite qui constitue le marqueur. L'analyse des produits amplifiés s'effectue sur gel d'acrylamide. Ces marqueurs ont été utilisés pour des études de la diversité génétique de nombreux agents phytopathogènes (Dutech et al., 2007, Bahri et al., 2009, Unartngam et al., 2011, Mahiout, 2017) ainsi que dans l'élaboration des cartes génétiques des plantes (Röder et al., 1995, Westman et Kresovich, 1999). Si les SSR constituent de bons marqueurs moléculaires (reproductibles, co-

dominants et aisés d'utilisation), leur caractérisation initiale est cependant assez lourde. En effet, leur production doit passer d'abord par le clonage et le séquençage de ces éléments répétés (Najimi et *al.*, 2003). L'amplification des microsatellites des ADN d'une collection de *Ascochyta rabiei* a permis de classer les isolats en plusieurs groupes, mais aucune corrélation avec l'origine géographique n'a pas été retrouvée (Bayraktar et *al.*, 2007).

Les SSRs sont constitués de répétition en tandem de motifs mono, di-, tri- ou tétranucléotidiques (Tagu et Moussard, 2003). Plusieurs chercheurs utilisent les marqueurs microsatellites pour détecter des variations génétiques parmi les isolats de *A. rabiei* (Bayraktar, 2007; Nourollahi et *al.*, 2011; Ali et *al.*, 2012; Mahiout, 2017). La technique PCR est utilisée pour révéler les loci microsatellites qui sont des marqueurs codominants et multialléliques.

e. ITSs (*Internal Transcribed Spacer*) ou Espaceur transcrit interne

Les gènes des unités ribosomiques présentent dans le génome de tous les organismes, est répétée en tandem chez les champignons. Les séquences de cette unité contiennent à la fois des régions variables et des régions conservées. Ainsi, la région ITS (*Internal Transcribed Spacer*, ou espaceurs transcrits internes) de l'ADN ribosomique (ADNr) est une zone assez bien conservée à l'intérieur d'une même espèce fongique mais elle est très variable d'une espèce à l'autre. La région est une partie de l'ADNr cistron qui se compose des séquences 18S, 5.8S, ITS1, ITS2, et de 28S. L'ITS1 et ITS2 sont les régions non codantes situées entre les 18S et 5,8S (ITS1) et entre le 5,8S et 28S (ITS2) région codante. Ces marqueurs constituant un bon indicateur taxonomique à l'échelle de l'espèce, chez bon nombre de champignons.

f. SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) ou Polymorphisme nucléotidique unique

Les marqueurs SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) constituant l'un des éléments les plus de marqueurs d'ADN qui sont devenus de plus en plus populaire et fortement offerts dans les études génomiques. Les SNPs, sont très abondants et répartis à la fois dans les régions codantes et non codantes de génome, et il peut se produire à 01 sur tous les 1000pb (Gaur et *al.*, 2012). SNP décrit un polymorphisme entre les témoignages par point de mutation qui donne lieu à des allèles différents. On observe un SNP lors du changement d'une base en une autre: transition ou transversion. Les transitions étant des changements d'une purine en une autre purine ou le changement d'une pyrimidine en une autre pyrimidine (Vignal et *al.*,

2002). Les transversions sont des changements de purines en pyrimidines et vice versa. Les SNP sont actuellement utilisés en phytopathologie pour la détection de polymorphisme moléculaire ainsi que la détection des mutations ponctuelles (Lamour et *al.*, 2006, Lee et *al.*, 2010, Patel et *al.*, 2011). Il existe actuellement de nombreuses techniques visant à mettre en évidence la présence de SNP dans l'ADN, telle que le séquençage complet du génome, puces à ADN, TaqMan... etc.

2.10. Méthodes de lutte contre l'antracnose « *Ascochyta rabiei* »

L'antracnose chez *Cicer arietinum* L. est le résultat d'une relation triangulaire qui fait intervenir l'hôte, le parasite et l'environnement, par conséquent, l'établissement d'une stratégie de lutte efficace doit impérativement tenir compte de ces trois éléments (Chandirasekaran, 2007). Les dégâts causés par cette maladie peuvent être réduits par des méthodes essentiellement prophylactiques (Zikara Zine, 2003) qui sont un ensemble de plusieurs moyens dans le but d'éliminer les foyers et sources d'infection (Davidson et Kimber, 2007).

2.10.1. Lutte culturale

Les méthodes de lutte culturale contre les maladies fongiques en générale concernent toutes les actions culturales qui peuvent créer des conditions défavorables aux pathogènes et favorables aux plantes. Parmi ces actions, la destruction (ramasser ou brûler) des repousses et des hôtes alternatifs qui peuvent former des réservoirs de pathogènes durant la saison où la culture est absente, est une action importante qui réduit le niveau d'inoculum primaire. L'interruption du cycle biologique de certains pathogènes est possible par la destruction de leurs hôtes secondaires comme dans le cas des rouilles (Nasraoui, 2008).

Selon Chérif et *al.*, (2007) l'utilisation des semences non infectées ou traitées pour prévenir l'infection du pois chiche durant la saison de croissance. Aussi, l'avancement de la date de semi du pois chiche du début de printemps vers la fin de l'hiver empêche le développement épidémique du flétrissement et minimise la sévérité de la maladie (Navas-Cortes et *al.*, 1998).

2.10.2. Lutte chimique

Plusieurs matières actives chimiques utilisées contre *A. rabiei* du pois chiche tels que fludioxinile, thiabendazole, carbathine, chlorothalonil, azoxystrobine, boscalid et

pyraclostrobine peuvent aider à réduire les dégâts. (Goodwin, 2008).

Concernant le traitement de semence plusieurs fongicides ont été proposés, le Thiram, Thiabendazole et Manabe (Gan *et al.*, 2006 et Kiven *et al.*, 2013). Cependant, en pleine végétation, le Chlorothalonil et le Mancozeb sont les plus efficaces contre l'*Ascochyta rabiei* (Gan *et al.*, 2006 et Kiven *et al.*, 2013).

Le traitement par les fongicides concerne aussi bien les graines qui sont utilisées comme semis, que les plantes dans les champs. Les graines peuvent abriter le pathogène jusqu'à deux ans même sous une température de 45 °C et plus de deux ans si elles sont stockées entre 2 et 5°C (Gan *et al.*, 2005). Différents moyens sont utilisés comme l'immersion dans de l'eau chaude à 53 °C pendant 15mn (Nene et Reddy, 1987) ou dans une solution de sulfate de cuivre (Davidson et Kimber, 2007).

L'application de fongicides foliaires efficaces joue un rôle prépondérant dans la réduction des dégâts causés par cette maladie (Chongo *et al.*, 2004). Le chlorothalonil appliqué sur les folioles au champ, stoppe la germination des spores (Singh et Reddy, 1984), cependant, d'après Steinberg *et al.* (2005), le résultat peut différer d'une région à une autre, quelques produits reconnus efficaces contre l'anthracnose du pois chiche comme le zineb et le captan n'ont donné aucun résultat. L'efficacité de ces fongicides dépend d'autres paramètres notamment le degré de résistance de la plante hôte, les conditions climatiques et l'architecture de la plante (Armstrong-Cho *et al.*, 2008).

2.10.3. Lutte biologique

Au début du XXème siècle l'appellation "lutte biologique" a été proposée pour désigner toute méthode phytosanitaire mettant en œuvre un organisme vivant. En 1919, Smith a défini la lutte biologique comme l'utilisation des ennemis naturels pour le contrôle des maladies phytopathogènes.

La lutte biologique consiste à combattre une maladie causée par un organisme au moyen d'un autre organisme. Dans le sens écologique strict, l'application de la lutte biologique peut être considérée comme une stratégie pour restaurer la biodiversité dans les agro-écosystèmes par l'addition des antagonistes naturels (parasite ou prédateur) par exemple *Trichoderma sp*, *Aspergillus* et des espèces endophytes. (Nautiyal *et al.*, 2000).

Singh *et al.* (2003) ont montré que *Pseudomonas fluorescens* peut réduire de 78% la maladie de la pourriture du collet de la plante de piment rouge causé par *Sclerotium rolfsii*.

Egalement, Mao *et al.* (1998) ont pu réduire en plein champ les maladies de la tomate due aux *S. rolfii*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* par l'utilisation de deux agents biologiques *Gliocladium vireus* et *Burkholderia cepacia*.

Le genre *Trichoderma* a été particulièrement étudié et plusieurs espèces ont révélé un grand effet antagoniste contre une multitude de maladies, d'autant plus que plusieurs produits phytosanitaires à base d'espèce de ce genre sont commercialisés (Fravel, 2005; Errakhi, 2008).

La réussite de la lutte biologique nécessite l'application d'un agent de biocontrôle efficace. L'efficacité est notamment liée à la capacité de l'agent de lutte biologique à coloniser et à s'installer dans le milieu rhizosphérique des plantes (Singh *et al.*, 2003).

2.10.4. Lutte génétique

L'utilisation de cultivars résistants est sans doute le moyen le plus pratique pour contrôler l'anthracnose chez *Cicer arietinum* L., c'est pourquoi l'objectif majeur de tout les programmes d'amélioration du pois chiche à travers le monde est la sélection d'espèces résistantes (Iqbal *et al.*, 2004 ; Iqbal et Ghafoor, 2005 ; Rhaïem *et al.* 2006 ; Kavousi *et al.*, 2009).

Bien que connue depuis presque un siècle l'anthracnose continue à être un problème pour les agriculteurs et peu de progrès ont été faits dans le domaine de la sélection de cultivars résistants (Singh *et al.*, 1992). Plusieurs travaux ont été entrepris surtout ces soixante dernières années dans le but de développer des génotypes de pois chiche résistants à l'anthracnose mais sans aucun résultat notable vu les sources réduites de résistance (Singh *et al.*, 1984 ; Bhardwaj *et al.*, 2010). D'un autre côté le champignon présente une variabilité génétique. Ceci fait constamment apparaître de nouveaux variant ou races physiologiques d'*Ascochyta rabiei* d'où la difficulté de développer des cultivars résistants utilisables à travers le monde (Singh et Reddy, 1990).

Pour conclure il est important de souligner que toute stratégie de lutte contre l'anthracnose du pois chiche doit impérativement intégrer plusieurs de ces méthodes citées, à la fois pour arriver à éradiquer ou limiter la propagation du pathogène.

Les premiers moyens de défense des plantes lors d'une attaque parasitaire sont d'ordre structural correspondant à la cuticule et la paroi secondaire (Mehrotra, 1983). Il s'en suit un

échange de molécules exogènes ou endogènes de nature protéique ou oligosaccharidique appelée éliciteurs (Angelova et *al.*, 2006 ; Hopkins, 2003 ; Ebel et Thöfer, 1998). Les enzymes d'oxydation comme la peroxydase et la polyphénoloxydase voient leur activité doubler en cas d'infection (Arfaoui et *al.*, 2005; Raju et *al.*, 2008 ; Saikia et *al.*, 2005 ; Raju et *al.*, 2009).

Les flavonoïdes, composés phénoliques sont les principaux constituants des phytoaléxines (Dixon et Paiva, 1995 ; Kessman et Barz, 1987). Les isoflavones formononetin et biochanin A sont constitutivement accumulés dans la vacuole. Ils sont libérés en cas d'élicitation pour être ensuite convertis en phytoaléxines ptérocarpans maackiain et medicarpin.(Chérif et *al.*, 2007 ; Jiménez-González et *al.*, 2008).

Partie II: Etude expérimentale

Chapitre III: Matériels et Méthodes

III.1. Prospection sur terrain

Objectif

L'objectif de la présente investigation est de déterminer la situation épidémiologique de l'antracnose du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) causée par *Ascochyta rabiei* dans différentes régions de la plaine intérieure et côtière de l'ouest algérien.

Des échantillons de pois chiche ont été collectés à travers cinq wilayates de l'ouest algérien à savoir Mascara, Sidi Bel Abbès, Relizane, Mostaganem et Ain Témouchent (Fig.19).

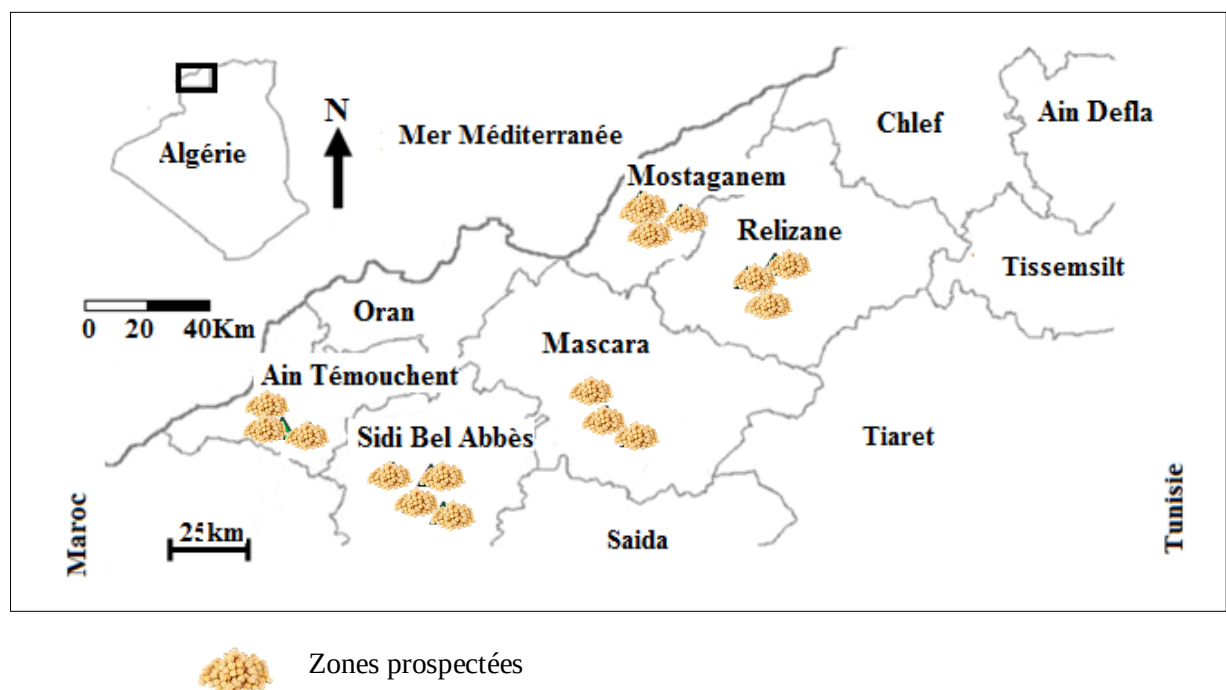


Figure 19: Régions prospectées : sources des échantillons de pois chiche pour la détection de *A. rabiei*.

Plusieurs prospections ont été réalisées dont l'objectif est de

- Déterminer la répartition géographique des foyers de l'antracnose.
- L'estimation de l'incidence et de la sévérité de la maladie sur la culture de pois chiche.
- Identification de l'agent responsable de la maladie de l'antracnose du pois chiche ainsi qu'une caractérisation morphologique des différentes souches du pathogène isolées à partir des échantillons infectés.

Le présent travail a été réalisé au sein de différents laboratoires selon leurs compétences: L'isolement des différents isolats de *Ascochyta rabiei* et leur caractérisation a été réalisé dans le

laboratoire de la SRPV de Mostaganem.

L'étude de l'effet des fongicides sur le développement du champignon a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie végétale de la faculté des sciences et de la technologie de l'université de Relizane.

La partie moléculaire de cette étude à savoir identification et caractérisation moléculaire des isolats a été réalisée au sein du laboratoire de DIAG-GENE. Angers France.

3.1.1. Matériel biologique

3.1.1.1. Matériel fongique

Le matériel fongique à savoir le champignon *Ascochyta rabiei* objet de cette étude a été isolé à partir des échantillons de plantes de pois chiche infectées et récoltées durant la période du mois de Mai et Juin lors de la campagne agricole 2015-2016, au stade ramification et maturité physiologique de la culture.

Une fiche d'enquête et un questionnaire ont été établis dans chaque région prospectée et pour chaque agriculteur.

Les dates de prospections et les caractéristiques des parcelles de pois chiche sources d'échantillons sont reportées dans le tableau 8.

Il est à noter que les régions prospectées sont des zones potentielles en matière de production et superficies dédiées aux cultures de pois chiche.

Les sites d'échantillonnage sont distants l'un de l'autre. Ils sont représentatifs de cinq zones de culture de milieu édaphique, topographique et climatique divers.

Les régions côtières, Mostaganem et Aïn Témouchent, se caractérisent par un climat tempéré avec une humidité relative élevée durant toute l'année. Par contre les régions des plaines intérieures, Relizane, Mascara et Sidi Bel Abbès, se caractérisent par des hivers rudes et des étés secs et chauds, s'étalant du mois de mai jusqu'en octobre.

Tableau 8 : Les parcelles prospectées du pois chiche de cinq régions choisies dans l'ouest Algérien (Campagne 2015-2016).

Régions	Sites de prélèvement	Parcelles (P) : Latitude / Longitude	Date des Prospections	Stade Physiologique
Plaine intérieure Mascara (3 parcelles prospectées)	-Maoussa	P1 : 35°22'42.20"N 0°12'50.53"E	Mai 2015	Ramification
	-Tighennif	P2 : 35°24'45.37"N 0°18'45.54"E		
	-Sidi kada	P3 : 31°20'33.17"N 0°15'42.44"E		
Ain Témouchent (3 parcelle prospectée)	-Hassi El Ghalla	P4 : 35°28'20.70"N 0°45'45.88"E	Mai 2015	Ramification
	-Beni Saf	P5 : 34°22'18.80"N 0°41'35.81"E		
	- Ain Kihal	P6 : 35°20'22.83"N 0°44'42.80"E		
Sidi Bel-Abbès (SBA) (4 parcelles prospectées)	-Tessala	P7 :35°14'33.75"N 0°45'50.94"O	Juin 2015	Maturation
	-Sidi Lahcene	P8 :35°10'22.66"N 0°41'54.83"O		
	-Attouche	P9 :35°11'32.50"N 0°43'48.90"O		
	-INRASBA	P10 32°12'27.56"N 0°44'52.73"O		
Côtière Mostaganem (3 parcelles prospectées)	-Sidi Ali	P11 : 35°10'40.22"N 0°27'33.28"E	Juin 2016	Maturation
	-Sidi Lakhdar	P12 : 36° 9'42.20"N 0°25'35.26"E		
	-Achacha	P13 : 33°11'41.22"N 0°20'31.20"E		
Relizane (3 parcelles prospectées)	-Mendes	P14 : 35°39'19.38"N 0°51'18.08"E	Juin 2016	Maturation
	-Yellel	P15 : 35°38'23.80"N 0°53'45.18"E		
	-Beni Dergoune	P16 : 33°48'33.70"N 0°33'35.28"E		

Lors des prospections, un diagnostic visuel de l'antracnose a été réalisé en plein champs sur la base des observations des symptômes typiques et visibles de la maladie.

En effet les plants de pois chiche présentant des lésions ou des nécroses sur tige, feuilles et gousses, ainsi qu'une taille réduite sont considérés atteints de l'antracnose. Ces derniers sont prélevés, mis dans des sachets, et transférés au laboratoire pour analyse afin de confirmer le diagnostic in-situ et procéder à l'isolement de l'agent causal (Fig.20)



Figure 20: Plantes de pois chiche présentant les symptômes de l'antracnose (Région de Sidi Bel Abbès) (Originale, 2020).

(a) : Nécrose au niveau des folioles ; (b) : Nécrose au niveau de la tige ; (c) et (d) : Nécrose au niveau de la gousse

3.2. Estimation de l'incidence et de la sévérité de la maladie au champ

Pour l'évaluation de l'incidence de l'antracnose, nous nous sommes basés sur le protocole adopté par Trapero-Casas, (1983). Le protocole est comme suit:

Au niveau de chaque parcelle, trois rangées d'environ 10 mètres de long chacune, ont été choisies arbitrairement, les plantes de chaque rangée ont été examinées et le nombre de plantes présentant des symptômes de l'antracnose a été relevé. L'incidence de la maladie (IC) a été ensuite exprimée par le pourcentage de plantes infectées.

Dans chaque parcelle, l'échantillonnage a été effectué au niveau des cinq micro-parcelles. Dans ces dernières, l'observation a porté sur trois rangées de 1 mètre linéaire.

$$IC (\%) = \text{Nombre de plantes infestées} / \text{nombre total de plantes} \times 100$$

L'estimation de cet indice a été évaluée selon l'échelle ci-dessous (Trapero-Casas, 1983): 0 (**nulle**), 0.1 à 5% (**peu élevée**), 5.1 à 20% (**moyennement élevée**), 20.1 à 50% (**élevée**), > 50% (**très élevée**).

La sévérité de la maladie a été estimée en se basant sur l'évaluation visuelle de la proportion des parties de la plante atteinte par l'antracnose (brunissement). Sur une superficie de 03 rangées, les plantes affectées ont été examinées et un indice de gravité leur a été attribué en fonction de l'importance des symptômes (Trapero-Casas, 1983) :

0 : Pas de symptômes

1 : Brunissement et ponctuations noirâtres du 1/3 de la plante.

2 : Même symptômes mais affectant les 2/3 de la plante.

3 : Symptômes identiques affectant la plante entière.

4 : Plante morte.

Le matériel fongique utilisé provient des échantillons de plantes infectées présentant des symptômes caractéristiques de la maladie. Il s'agit d'échantillons de tiges, de feuilles et de gousses. Au niveau de chaque site prospecté, les différents symptômes sont décrits ainsi que le stade végétatif.

3.2.1. Conservation des échantillons de pois chiche

A partir de chaque parcelle, dix plants malades ont été entièrement arrachés et mis dans des sacheries en papier, étiquetés (date, numéro d'échantillon et lieu de prélèvement) et fermés hermétiquement afin d'éviter toute contamination par d'autres agents. Les échantillons sont transférés au laboratoire pour analyse (Tab.9).

Tableau 9: Origine géographique et désignation des isolats de *A. rabiei* dans l'ouest Algérien.

Isolats	Origines Géographiques	Sites	Dates d'isolement	Organes d'isolement	Nombre d'isolats
MSC1	Mascara	Maoussa	Nov-2015	Gousse	1
MSC2	Mascara	Tighennif	Déc-2015	Gousse	1
MSC3	Mascara	Sidi Kada	Déc-2015	Tige	1
AT1	Ain Temouchent	Hassi El Ghalla	Nov-2016	Gousse	1
AT2	Ain Temouchent	Beni Saf	Oct- 2015	Tige	1
AT3	Ain Temouchent	Kihal	Sept-2015	Tige	1
SB1	Sidi Bel Abbes	Tassala	Sept-2015	Tige	1
SB2	Sidi Bel Abbes	Sidi Lahsen	Oct- 2015	Tige	1
SB3	Sidi Bel Abbes	Attouche	Oct- 2015	Gousse	1
SB4	Sidi Bel Abbes	INRASBA	Oct- 2015	Gousse	1
MOS1	Mostaganem	Sidi Ali	Sept-2016	Gousse	1
MOS2	Mostaganem	Sidi Lakhdar	Sept-2016	Tige	1
MOS3	Mostaganem	Achacha	Oct- 2016	Tige	1
REL1	Relizane	Mendes	Oct- 2016	Tige	1
REL2	Relizane	Yellel	Oct- 2016	Tige	1
REL3	Relizane	Beni Dergane	Sept-2016	Gousse	1
16		16			16

3.2.2. Méthode d'isolement.

L'isolement est effectué selon la méthode décrite par Grewal en 1984 à partir des différentes parties aériennes des plantes infectées (feuilles, tiges, gousses et graines) suivant les étapes ci-dessous:.

- Lavage des échantillons de pois chiche avec l'eau du robinet pour éliminer les impuretés.
- Désinfection superficielle des tissus infectés à l'aide d'un coton imbibé d'éthanol 96°.
- Des fragments de 0,5 à 1 cm de longueur de tissus végétal sont découpés à la limite de la nécrose (front d'attaque du parasite) et déposés pendant 1 minute dans une solution d'hypochlorite de sodium diluée à 1% afin d'éliminer les saprophytes.
- Les tissus sont rincés par la suite pendant 3mn avec de l'eau distillée stérile puis étalées pour séchage sur un papier buvard stérile pour une période de 3 mn.

Les fragments de tissus ainsi découpés sont déposés à raison de cinq fragments par boîte sur un milieu de culture CSMDA (Chickpea Seed-Meal Dextrose Agar) qui favorise une bonne croissance mycélienne et une sporulation importante (Fig.21) (Basandrai et *al.*, 2005 ; Bayraktar et *al.*, 2007). (Annexe1)

- Les boîtes de Petri sont transférées pour incubation à 25 °C dans une étuve. Trois répétitions sont retenues pour chaque échantillon.
- Une fois les colonies formées avec l'apparition des filaments mycéliens autour des fragments, on procède à l'identification des pycnides et des pycnidiospores à l'aide d'un microscope optique aux différents grossissements (x10, x40 et x100). Les fructifications obtenues sont caractéristiques à *Ascochyta rabiei*.

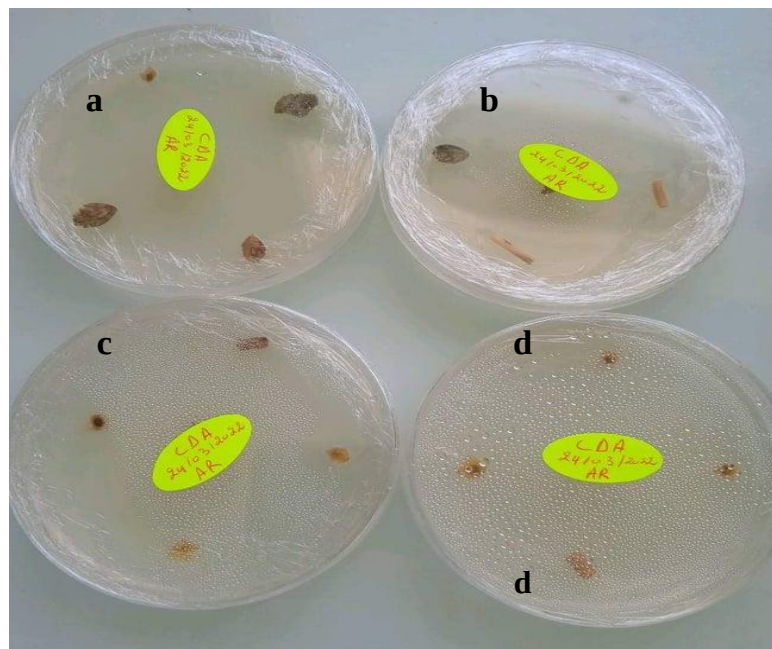


Figure 21. Isolement de *A. rabiei* à partir des fragments sur milieu de culture CSMDA ;
a : folioles ; **b :** folioles et tiges ; **c :** fragments des gousses ; **d :** gousses et tiges

Afin de travailler avec des souches génétiquement homogènes, nous avons été obligés de passer par la culture monospore.

Une suspension de spores a été préparée en prélevant un explant à partir d'une culture âgée de 15 jours.

L'explant est mis dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile puis agité à l'aide d'un vortex.

Des dilutions jusqu'à 10^{-3} ont été réalisées et un volume de 0,5 ml de la dernière dilution est étalée sur une boîte de Pétri contenant un milieu Gélose à 2% (Annexe2),

Après 3 à 4 jours, et à l'aide d'une loupe binoculaire, les spores germées sont prélevées puis ensemencées aseptiquement sur milieu CSMDA solide (Bouznad, 1989 ; Zerrouk, 1994). Pour l'identification du pathogène, nous nous sommes basés sur les caractères décrits par Punithalingham et Holliday en 1972.

3.2.3. Conservations des isolats de *A. rabiei*

- **Conservation sur milieu gélose inclinée:** Les cultures purifiées âgées de 7 jours sont conservées dans des tubes à essai retenus inclinés contenant le milieu de pois chiche gélosé. Les tubes sont maintenus pendant trois jours à une température de 22°C puis conservés à 5°C

pour favoriser leur viabilité afin de les utiliser dans des tests ultérieures (Rapilly, 1968 ; Zerroug, 1994) (Fig.22).

- **Conservation sur milieu solide :** Les isolats du champignon sont conservés dans des boîtes de Petri contenant le milieu de culture CSMDA (Chickpea Seed-Meal Dextrose Agar) (Jamil *et al.*, 2002) à une température de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ (Dolar *et al.*, 1994).



Figure 22 : Conservation des isolats de *A.rabiei* sur milieu gélosé

III.2. Etude de quelques facteurs abiotiques sur la croissance de *A.rabiei*.

Cette étude a pour but la mise en évidence *in vitro* l'influence de certains facteurs nutritionnels (milieux de culture), physiques (température, éclairage) et chimiques (pH) sur la séquence biologique (la croissance mycélienne) de *A.rabiei*.

Dans cette étude, nous avons utilisé cinq isolats de *A.rabiei* (MSC1, AT1, REL1, MOS1 et REL1) susciter en (Tab.09).

3.2.1. Effets du milieu de culture

Pour toutes les espèces fongiques, le choix d'un milieu de culture dépend des exigences nutritionnelles du champignon (Bouznad, 1989). Ainsi pour l'agent d'anthracnose, le problème se pose différemment puisqu'elles peuvent se développer sur une large gamme de milieux de cultures qui peuvent être organiques, minéraux ou semi organiques.

Dans cette étude, un certain nombre de milieux de culture communément utilisés en phytopathologie ont été testés. Le choix du milieu est basé sur son adéquation pour un bon

développement du pathogène. Etant donné qu'il s'agit d'un champignon hétérotrophe. Quatre (04) milieux de culture ont été retenus (milieux organiques: Malt, PDA, CSMDA et Sabouraud) (Bernier et *al.*, 1984). La composition des milieux est en Annexe 3.

Sous des conditions rigoureuses d'asepsie, un explant de 5 mm de diamètre de chaque isolat est prélevé à partir d'une culture âgée de 10 jours et ensemencé au centre des boîtes de petri avec les différents milieux de culture à testés. Les boîtes ainsi ensemencées sont transférées pour incubation à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ (Jamil et *al.*, 2002) et sous lumière alterne. Trois répétition ont été retenues pour chaque milieu de culture

Le pH des milieux est ajusté à 5.8 avec une solution de HCl à 0.1N avant l'addition de gélose. La stérilisation des milieux est réalisée par autoclavage à 120°C pendant 30mn. Lorsque le milieu est utilisé à l'état liquide, il est réparti à raison de 150 ml dans des erlenmeyers de 250 ml avant l'autoclavage.

3.2.2. Effets de la lumière sur la croissance mycélienne de *A.rabiei*

De nombreux travaux ont été réalisés sur l'étude de l'effet de l'obscurité et la lumière sur la croissance et la sporulation des champignons. La durée de l'éclairage, son intensité et sa qualité peuvent jouer un rôle capital dans la croissance et surtout la sporulation. Sur cette base nous avons tenté dans une première étape, de rechercher d'abord le cycle d'éclairage le plus favorable aussi bien pour la croissance que pour la sporulation. Les durées utilisées sont citées ci-dessous:

- Eclairage continu.
- La photopériode de 12 heures.
- Obscurité continue (à température de $20 \pm 2^\circ\text{C}$).

3.2.3. Effets de la température sur la croissance mycélienne de *A.rabiei*

La température joue un rôle déterminant dans la croissance des champignons et par conséquent sur l'importance des maladies cryptogamiques. Elle influe sur la multiplication du champignon ainsi que sur son métabolisme (action sur la vitesse des réaction chimiques et biochimiques) (Henri et *al.*, 1995). Pour ce faire on procède à la détermination de la température optimale du développement, pour cette étude des explants de 5 mm de diamètre ont été prélevés à partir d'une colonie âgée de 10 jours et placés dans des boîtes de Pétri sur milieu CSMDA.

Les boîtes sont incubées aux différentes températures (10°C, 22°C, 25°C, 30°C et 35°C) pendant 14 jours et sous une lumière alterne.

3.2.4. Effet du pH sur la croissance mycélienne de *A.rabiei*

Pour étudier ce facteur et déterminer le pH optimum, nous avons cultivé les isolats âgés de 10 jours dans des boîtes de Pétri contenant du milieu CSMDA. Les boîtes sont incubées à (20 ± 2 °C) pendant 10 jours, sous une lumière alterne. Différentes gamme de pH a été utilisée: 4; 5.5; 6; 6.5; et 8. Le pH est ajusté avec des solutions de NaOH 2N et HCL: N/10

3.2.4. Evaluation de la croissance mycélienne de *A rabiei*

3.2.4.1. En milieu solide

La croissance mycélienne est exprimée par le diamètre moyen des colonies déduit du diamètre de l'explant. Pour l'estimation de la croissance mycélienne du pathogène, la technique utilisée est celle indiquée par Rapilly en 1968.

3.2.4.2. En milieu liquide

Dans certains essais, l'usage des milieux non gélosé s'impose et par conséquent, l'évaluation de la croissance mycélienne est exprimée dans ce cas par le poids sec des cultures après incubation et dessiccation. À la fin de l'incubation, les cultures sont filtrées sur du papier filtre. Elles sont ensuite déposées sur des verres de monte. Après un séjour de 24 heures dans une étuve réglée à 80 °C, le mycélium est pesé, la croissance dans ce cas est exprimée en milligrammes de poids sec de mycélium par millilitre de milieu de culture.

3.2.5 Traitement statistique

Le traitement statistique des données sont analysées à l'aide d'un logiciel de StatBox 6.0.4 Grimmer Soft. Trois répétitions sont retenues pour chaque facteur étudié. Les données sont traitées par une analyse de la variance suivie d'une comparaison des moyennes par le test Newman Keuls à 5 et 1%.

III.3. Caractérisation culturelle et morpho-biométrique de *A.rabiei*

3.3.1. Caractérisation culturelle et description des différents morphotypes

Les caractères du champignon sont observés sur des thalles âgés de 10 jours et provenant

d'un clone (culture monosporelle) de façon à éviter les variations morphologiques qui seraient dues à plusieurs souches. Toutes les cultures sont soumises à des conditions identiques: température de 20 ± 2 °C, lumière alternée (12 h de photopériode).

3.3.2. Caractérisation morphologique de l'agent pathogène

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

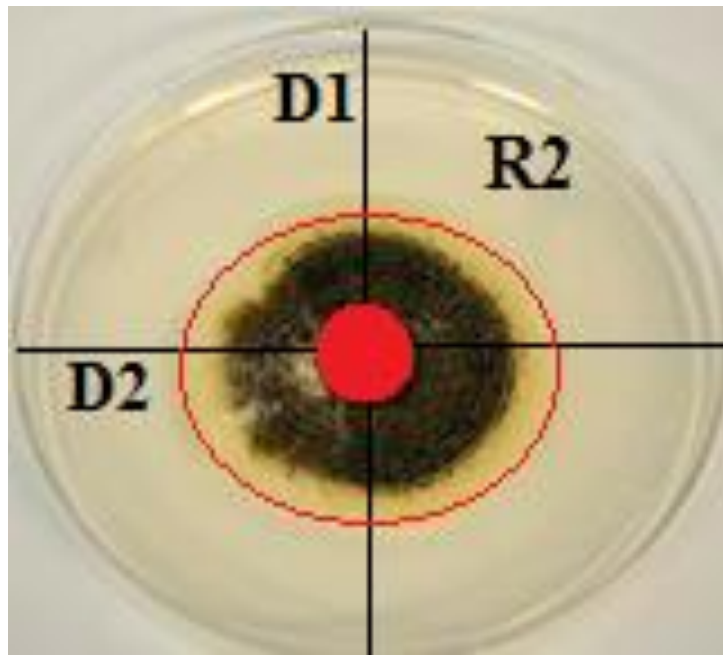
3.3.2.1. Caractérisation macroscopique

L'étude des caractères macroscopiques de seize (16) isolats est basée sur la description morphologique des colonies incubées pendant 15 jours sur milieu CSMDA à une température de 20 ± 2 °C et sous une photopériode de 12 heures.

Les critères retenus pour la caractérisation des colonies sont la couleur de la face supérieure des colonies, aspect du mycélium, abondance des pycnides, couleur du cirrhe. vitesse de croissance (mm/j) et la croissance mycélienne (mm).

▪ *Evaluation de la croissance mycélienne.*

A l'aide d'un emporte pièce stérile, des explants circulaires de 5 mm de diamètre sont prélevés à partir d'une colonie âgée de 10 jours. Chaque explant est déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu CSMDA. Le diamètre de la colonie a été évalué en mesurant les diamètres perpendiculaires de la colonie au bout du dixième jour de culture (Fig.23). Pour chaque isolat, nous avons réalisé 3 répétitions. Les boîtes sont mises à incuber à 20 ± 2 °C sous une lumière blanche alternée (une photopériode de 12 heures).



● : Explant

Figure 23 : Schéma représentatif de la méthode de mesure de la croissance linéaire et diamétrale du mycélium du champignon

Pour l'estimation de la croissance mycélienne du pathogène, la technique utilisée est celle indiquée par Rapilly en 1968, qui consiste à mesurer la croissance linéaire et diamétrale des isolats du champignon. Elle a été évaluée par la mesure de la croissance mycélienne dans le temps d'un explant de 5mm de diamètre par l'application de la formule suivante:

$$L = \frac{D - d}{2} \quad \text{Rapilly (1968)}$$

L : Croissance mycélienne en mm (Moyenne de deux mesures radiales)

D : Diamètre de la colonie en mm.

d : Diamètre de l'explant initial (en mm).

La vitesse de croissance (mm /j) est calculée en appliquant la formule suivante:

$$V = \frac{(L_2 - L_1) + (L_3 - L_2) + (L_4 - L_3) + \dots + (L_{n-1} - L_n)}{n - 1}$$

V = Vitesse de croissance (mm/j).

L = Croissance mycélienne (mm).

L₁ = Croissance mycélienne au 1^{er} jour.

L_n = Croissance mycélienne du dernier jour.

n = Nombre de jours durant le test.

3.3.2.2. Caractérisation microscopique des isolats

L'étude de quatre critères a été réalisée par une caractérisation microscopique des isolats : Couleur des pycnides, forme des pycnides, forme des pycnidiospores, nombre des pycnidiospores.

L'étude des quatre premiers caractères est effectuée sur un échantillon de 100 individus (pycnides ou pycnidiospores) prélevés à partir d'une culture âgée de 15 jours, produits dans les conditions citées ci-dessus.

▪ *Evaluation de la sporulation*

A l'aide d'un emporte pièce, trois explants de 5 mm de diamètre ont été prélevés à partir d'une colonie mycélienne âgée de 20 jours. Les explants sont déposés dans un tube à essai contenant 10 ml d'eau distillée stérile. Après agitation, le nombre de spores par ml est évalué à l'aide d'une cellule de numération de malassez, à raison de trois (3) répétitions de comptage (Annexe 2).

Un petit fragment de mycélium est prélevé à partir d'une colonie, il est écrasé entre lame et lamelle dans une goutte d'eau distillée. L'observation se fait au microscope optique avec les grossissements x10, x40, x100.

Le dénombrement de spores est réalisé selon la formule suivante :

$\begin{array}{lcl} n & \longrightarrow & V \cdot 10^{-3} \text{ ml} \\ N & \longrightarrow & 1 \text{ ml} \end{array}$	$N = \frac{n \cdot 1}{V \cdot 10^{-3}} = (\text{nombre de spores / ml})$
---	--

V = Volume d'un petit carré (m³)

n = Moyenne du nombre de spores (germes/ml).

N = Nombre de spores dans le petit carré.

3.3.3. Caractérisation biométrique des conidies de *A.rabiei*

Toutes les mensurations réalisées ont été faites à partir d'analyse d'images. Selon Voge, (2008), les informations quantitatives peuvent aussi être extraites de ces images à l'aide de logiciels d'analyse. Des observations microscopiques complémentaires sur le type de conidies, la forme permettent une meilleure caractérisation des isolats.

3.3.3.1. Mensuration des conidies des isolats de *A.rabiei*

La variabilité morphologique étant un des critères privilégiés de la diversité des populations (Ayad et *al.*, 2014). Une estimation des dimensions de la longueur et de la largeur des pycnidiospores est réalisée ; cette mensuration est effectuée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (Annexe 4).

La caractérisation des 16 isolats choisis, a été effectuée sur des spores âgées de 15 jours. L'examen direct au microscope optique (Motic) a un grossissement 10x40.

Les images obtenues avec un appareil-photo numérique (10.1 Mega -pixels), ont été transférées au micro portable et analysés en utilisant le logiciel d'analyse d'image (NIH image J, 1.44 p). La longueur (**L**), la largeur (**H**) ont été déterminées (Fig.24) tel que décrit par Anikster et *al.*, en 2005. Les dimensions de 100 pycnidiospores par isolat ont été mesurées. La longueur et la largeur des pycnidiospores ont été mesurées selon la disposition de l'axe de la meilleure ellipse convenable (Anikster et *al.*, 2005).

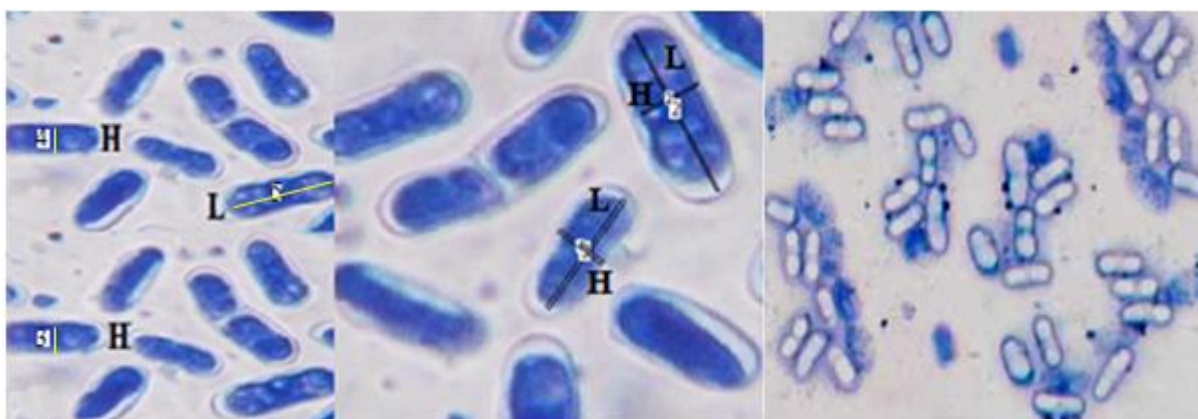


Figure 24 : Les différents paramètres mesurés (Longueur: **L** et Largeur: **H**) des pycnidiospores de *A.rabiei*.

3.3.4. Traitement statistique

Les résultats de mesure de longueur et largeur ont été enregistrés automatiquement sur feuille Excel et sont rapportés comme une moyenne pour chaque isolat. L'analyse statistique des résultats a été effectuée par le logiciel Stat Box (Version 6.4.) et la signification des différences des moyennes des isolats a été déterminée par ANOVA.

III.4. Evaluation de la variabilité pathogénique et des pathotypes de *A.rabiei*

L'objectif de cette partie de notre étude est d'évaluer l'effet de la concentration d'inoculum de *A. rabiei* sur la sévérité de la maladie. Treize (13) lignées de pois chiche dont six sont locales et sept introduites ont été testés (Tab.10). Ces lignées ont été fournies par le laboratoire de mycologie de l'INRA de Sidi Bel Abbès.

Les isolats de *A. rabiei* isolés et utilisés dans cette étude ont été conservés à une température de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ dans des boîtes de Petri contenant le milieu de culture CSMDA (Dolar et al., 1994).

Tableau 10. Différentes lignées de pois chiche et leurs origines (INRASBA, 2017)

Lignées de pois chiche	Types	Origines
ILC 482	Kabuli	ICARDA*
F 97-657	Kabuli	ICARDA
ILC 3279	Kabuli	ICARDA
ILC 263	Kabuli	ICARDA
F 03-19C	Kabuli	ICARDA
Flip 05-69C	Kabuli	ICARDA
INRA199	Desi	INRA**
F10-25	Kabuli	Locale
F10-5/11	Kabuli	Locale
Col 08	Kabuli	Locale
GP 10	Kabuli	Locale
Col 25/24	Kabuli	Locale
F482	Kabuli	Locale

3.4.1. Test de la faculté germinative

Pour déterminer la faculté germinative des lignées de pois chiche utilisées, 10 grains de chaque lignée ont été mis à germer dans des boîtes de pétri sur un coton humectés avec de l'eau distillée stérile. Les boîtes de pétri sont placées dans des conditions favorables de température (25°C). Après une semaine on comptabilise le nombre de graines germées (Fig. 25).

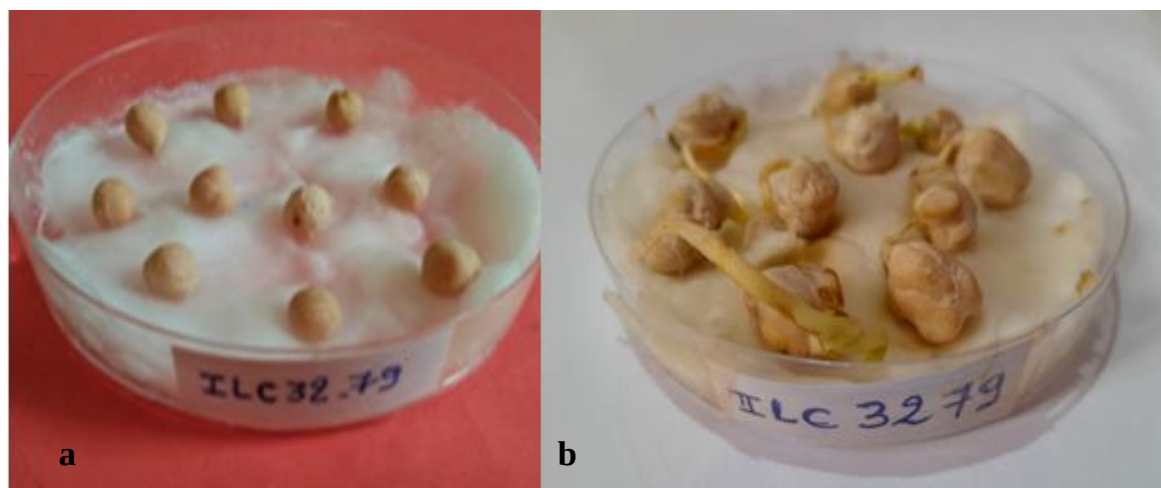


Figure 25 : Test de la faculté germinative des lignées de pois chiche (Ex : ILC 3279)
a : Pré germination des graines **b.** Germination des graines

3.4.2. Conditions d'obtention des plantules

Les graines des 13 lignées ont été préalablement désinfectées par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium 2 % pendant 5 mn, suivi de trois rinçages à l'eau distillée stérile.

Les graines sont déposées par la suite dans des pots de 10 cm de hauteur et 6 cm de diamètre contenant une tourbe stérile, à raison de 2 graines/ pot et cinq (5) répétitions par lignée. Les pots sont placés sous les conditions suivantes:

- Une photopériode de 12 heures.
- Température jour et nuit : 20 °C.
- Humidité relative : environ 70%.

Après le développement des plantules, ces dernières sont soigneusement arrosées tous les 1/2 jours. Au bout de 08 jours, les plantules atteignant stade des deux premières feuilles étalées ont été sélectionnées pour l'inoculation (Fig. 26).



Figure 26. Conditions d'obtention des plantules :

a): Semis des gaines de pois chiche dans des pots contenant la tourbe sébile ; **b):** jeunes plantules de pois chiche.
Après 14 jours

3.4.3. Méthodes d'inoculation des plantules (Test d'inoculation)

Les isolats *A. rabiei* sont dans un premier temps, inoculés sur une variété sensible (ILC 263) afin de régénérer leur pouvoir pathogène. À partir d'organes présentant des symptômes, les champignons sont réisolés et cultivés en boîtes de Pétri sur milieu CSMDA. Après 15 jours de culture, les colonies sont submergées par de l'eau distillée stérile et grattées avec une pipette Pasteur coudée pour mettre un maximum de spores en suspension. Une goutte de Tween 80 permet d'avoir une suspension de spores homogène. La concentration est ajustée à 5.10^5 spores/ml à l'aide de la cellule de Malassez.

L'inoculation a été effectuée par un pulvérisateur en plastique sur des plantes âgées de 15 jours (stade 4 à 5 feuilles). Les pots sont d'abord mis dans des bacs en plastique fermés à raison de 15 pots par bac (40 cm x 20 cm) (Fig.27) et transférés pour continuer leur développement dans une serre tout en assurant un arrosage quotidien par aspersion avec de l'eau distillée stérile jusqu'à l'apparition des premiers symptômes (Türkkan et Dolar, 2009).



Figure 27: Dispositif des plantes à l'intérieur des bacs en plastique avant inoculation
(Ex : ILC 3279)

Ci-dessous le dispositif expérimental du test d'inoculation des différentes lignées de pois chiche par les isolats de *A.rabiei* à raison de 15 pots dans des bacs en plastique (Fig. 28)

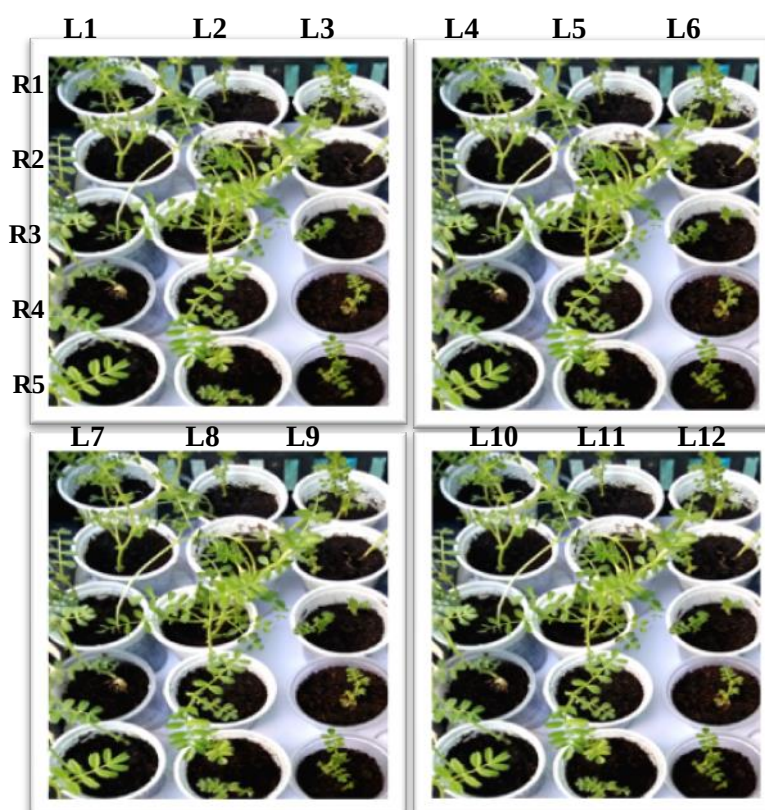


Figure 28 : Le dispositif expérimental des 12 lignées de pois chiche inoculées par un isolat de *A.rabiei* dans des bacs en plastique (R = répétition, L= Lignée).

3.4.4. Notations et évaluations du taux d'infection

Les notations ont porté sur:

- La période d'incubation : nombre de jours écoulés entre la date d'inoculation et l'apparition de la première lésion visible sur la plante ;
- La période de latence : nombre de jours écoulés entre la date d'inoculation et l'apparition de la première pycnides sur ses lésions (Zikara-Zine et Bouznad, 2007) ;
- La sévérité de la maladie a été évaluée selon l'échelle décrite par Reddy et Singh (1984) allant de 1 à 9 (Tab.11). Elle est notée (21 jours après l'inoculation) basée sur l'intensité des symptômes (Fig. 29).

Tableau 11. Echelle quantitative à 9 points pour la notation des réactions du pois chiche à *A. rabiei* (Reddy et Singh, 1984).

Notations	Taille de lésion sur la tige	Types de réaction
1	Non visible	Plante saine
2	0-2 mm de long	Résistante
3	2-6 mm de long	Résistante
4	6 mm de long avec lésion annulaire.	Résistante
5	6 mm de long et plus avec cassure (40% de branches cassées par plante).	Modérément sensible
6	6 mm de long et plus avec cassure (50% de branches cassées par plante).	Modérément sensible
7	6 mm de long et plus avec cassure (75% de branches cassées par plante).	Sensible
8	6 mm de long et plus avec cassure (100% de branches cassées par plante).	Sensible
9	Plante complètement détruite	Très sensible

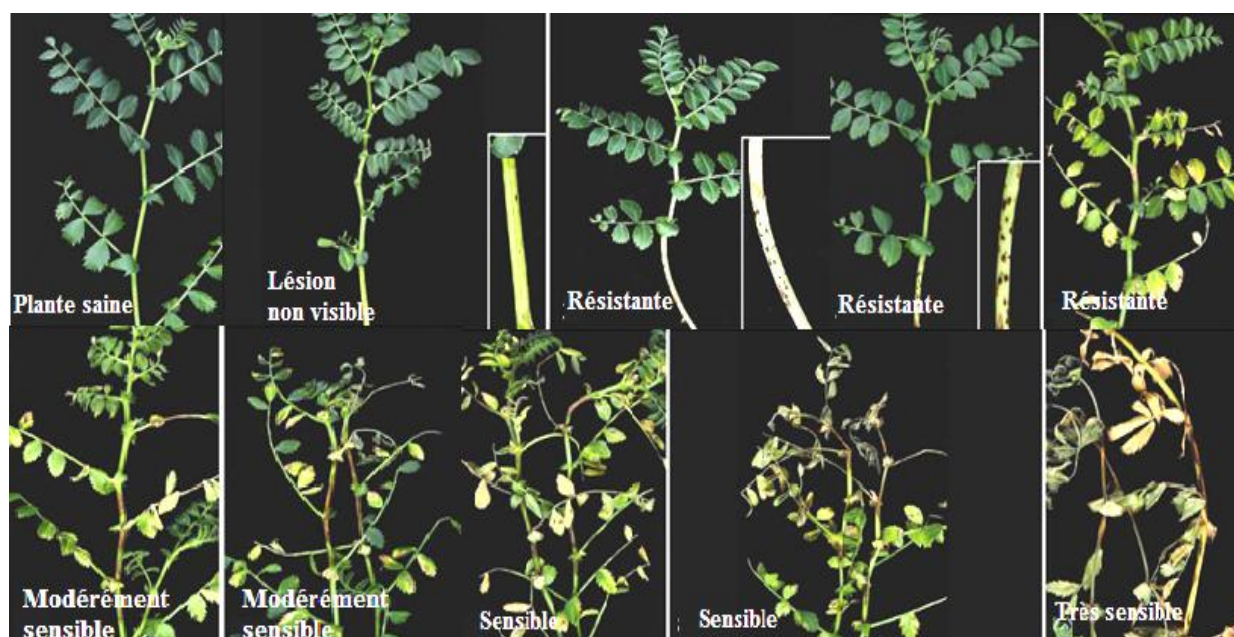


Figure 29. Echelle quantitative à 9 points pour la notation des réactions du pois chiche à *A. rabiei* (Reddy et Singh, 1984).

A partir de cette échelle, les lignées de pois chiche classé de 1.0 à 4.9 sont considérées comme résistantes et celles qui sont codées de 5.0 à 9 sont sensibles (Türkkan et Dolar, 2009).

Le classement des isolats de *Ascochyta rabiei* se base sur les intervalles de degrés de l'agressivité et le type de variété (Tab.12) (Jamil et al., 2002).

Tableau 12 : Degrés de l'agressivité de *A. rabiei* et la réaction des lignées de pois chiche. (Jamil et al., 2002).

Classement	Degrés de l'agressivité	Type des lignées
1 - 3.9	Isolat non agressif	Résistante (R)
4 - 5.9	Isolat moyennement agressif	Tolérante (T)
6 – 9	Isolat hautement agressif	Sensible (S)
6 – 7.9	Isolat hautement agressif	Sensible (S)
8 – 9	Isolat hautement agressif	Très sensibles (TS)

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

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

IA : Indice d'attaque

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

N : Nombre total de plantes inoculées.

Les méthodes de préparation de l'inoculum et d'inoculation des plantules de pois chiche sont schématisés dans la figure ci-dessous (Fig.30).

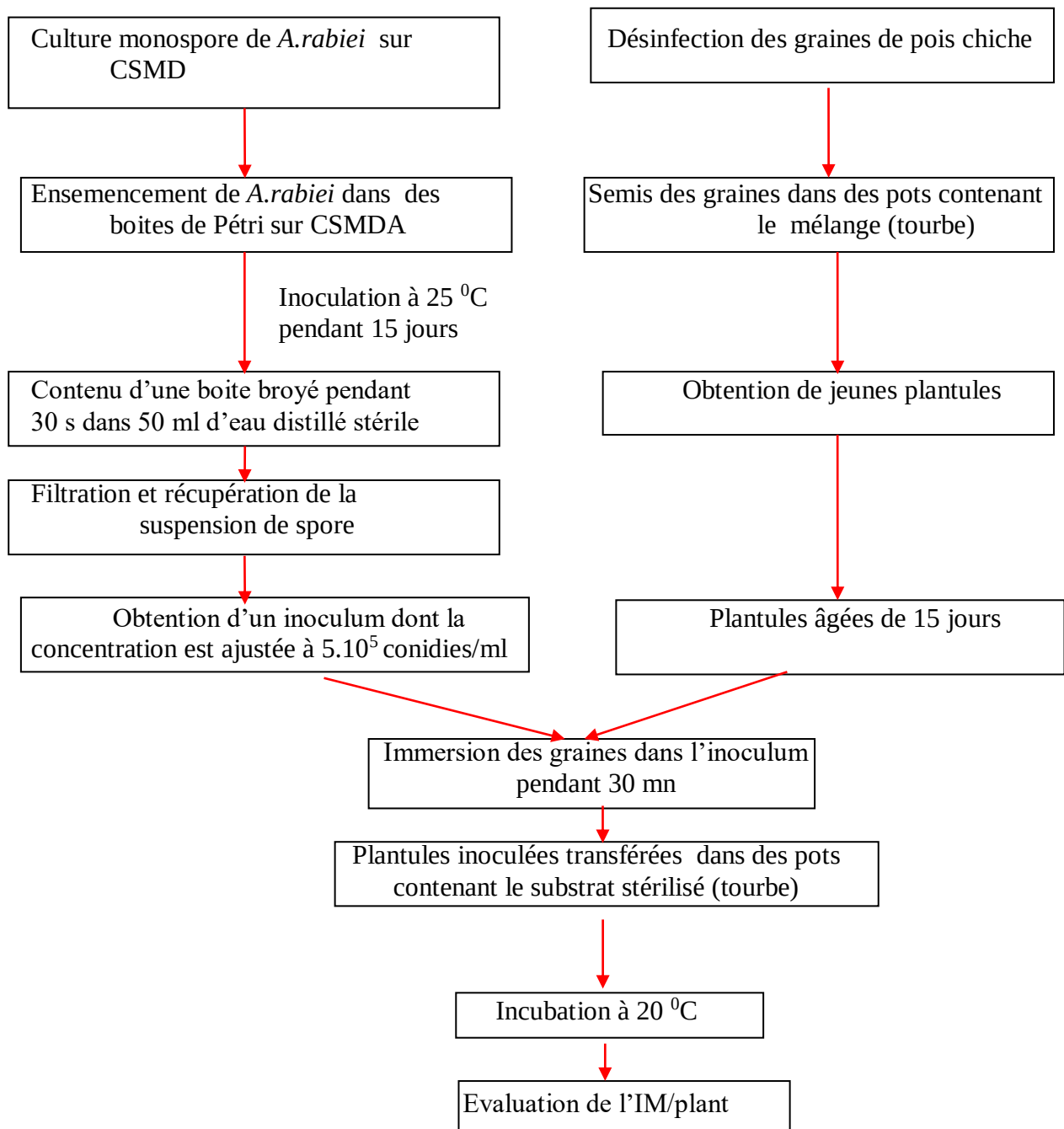


Figure 30: Schéma de préparation de l'inoculum et inoculation des plantules de pois chiche

3.4.5. Traitement statistique

Trois répétitions sont retenues pour chaque paramètre étudié. L'analyse du test de pathogène a été réalisée à l'aide d'une logiciel Stat Box du test de Newman et Keuls à 5 et 1%.

3.5. Détermination des pathotypes de *A. rabiei*

Le terme pathotype été utilisé récemment pour décrire les niveaux d'agressivité des isolats

avec un petit ensemble de génotypes différentiels (Jamil et *al.*, 2000; Chen et *al.*, 2004).

La détermination des pathotypes de *A. rabiei* est basée sur la réaction d'un ensemble de lignées de pois chiche différentielles vis-à-vis de divers isolats de *A. rabiei* (Türkkan et Dolar, 2009 ; Jamil et *al.*, 2000 ; Chen et *al.*, 2004).

3.5.1 Matériel végétale

Pour cette étude, nous avons utilisé trois (03) lignées différentielles de pois chiche dont deux lignées fournies par INRA de Sidi Bel Abbès (ILC 482 et ILC 3279) et une lignée (ILC 1929) nous a été fournie par la station des grandes cultures (ITGC) (Ain Elhadjar) de Saida.

3.5.2. Inoculation des plantules

Pour la détermination des pathotypes de *A. rabiei*, trois cultivars de pois chiches (ILC 1929, ILC 482, ILC 3279) ont été utilisés (Udupa et Weigand, 1997).

Quinze (15) jours après le semis, les plantules au stade 4-5 feuilles sont inoculées avec les isolats de *A. rabiei* à l'aide d'un vaporisateur. Pour maintenir une humidité suffisante pour le développement de la maladie, les plantules sont pulvérisées avec de l'eau distillée stérile 2 fois par jour (Türkkan et Dolar, 2009) (Fig.31). Trois répétitions sont retenues avec chacune des isolats et 15 plantes par lignée. Les conditions d'obtention des plantes et d'inoculation sont sus-citées.



Figure 31 : Dispositif expérimental des plantes à l'intérieur des bacs en plastique avant inoculation (ILC 1929).

3.5.3. Notation de la maladie

L'échelle de notation est basée sur l'intensité des symptômes. Elle est graduée de 1 à 9 (Singh et *al.*, 1981) (Fig.29) et se présente comme suit:

- 1 : Aucune lésion n'est visible sur l'ensemble des plantes.
- 3 : Lésions visibles sur moins de 10% des plantes, les tiges ne sont pas atteintes.
- 5 : Lésions sur 25% des plantes, avec des dégâts sur environ 10% des tiges.
- 7 : Lésions sur toutes les plantes, environ 50% des tiges sont atteintes, ce qui entraîne la mort de certaines plantes à cause de sérieux dégâts.
- 9 : Lésions diffusées sur toutes les plantes, les tiges sont atteintes dans des proportions supérieures à 50% avec la mort de la majorité des plantes.

III.5. Test *in vitro* et *in vivo* des fongicides systémiques sur la croissance mycélienne des isolats de *A.rabiei*

L'objectif de cette étude est basé sur l'efficacité *in vitro* et *in vivo* de quelques fongicides systémiques du groupe des benzimidazole (*benomyl* et *carbendazime*) sur la séquence biologique (la croissance mycélienne) des isolats de *A.rabiei*, l'évaluation du taux d'inhibition chez tous les isolats étudiés et sur l'incidence de ce pathogène.

3.5.1. Matériel végétale

- **Lignées de pois chiche** : Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de trois (03) lignées, fournies par l'INRAA / URO de Sidi Bel Abbés. Il s'agit de (ILC482, F1025 et Col08) (Chapitre III, Tab.10). Ces lignées ont été utilisées pour tester des contrôles *In vivo* et *In vitro* en utilisant des fongicides systémiques contre *A. rabiei*.

3.5.2. Test de l'efficacité des fongicides

3.5.2.1. Test « *in vitro* » des fongicides avec *A. rabiei*

a. Fongicides étudiés

Dans le but d'étudier l'effet de certaines matières actives de synthèse sur la croissance mycélienne de *A. rabiei*, deux (02) fongicides ont été testés. Il s'agit du *benomyl* (Benlate®) et *carbendazime* (Bavestine®) (Tab.13).

Tableau 13: Fongicides systémiques utilisées pour le test *In vitro* (Goodwin, 2008)

Matière actif	Concentration de Matière active	Formule chimique	Auteurs
Benomyl (Benlate®)	150 g/hl	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	Wise et <i>al.</i> , 2011
Carbendazime (Bavestine®)	50 g/hl	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	Demirci et <i>al.</i> , 2003; Gan et <i>al.</i> , 2006

b. Technique et principe de confrontation

Les méthodes de laboratoire qui permettent d'estimer les propriétés fongicides d'un produit sont nombreuses mais reposent toutes sur même principe, celui de confronter le fongicide et le champignon sur un support artificiel.

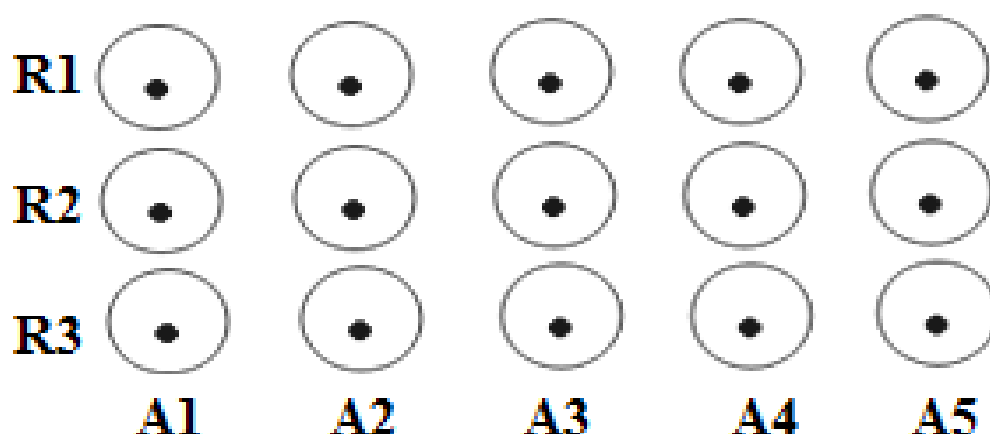
La confrontation « *in vitro* » est effectuée par la méthode de Trapero-Casas et Kaiser (1992).

Les deux fongicides systémiques ont été incorporés aseptiquement, à la dose homologuée (1,5 g/l pour le *Benomyl*, 0,5g/l pour *Carbendazime* (Goodwin, 2008), dans le milieu de culture CSMDA maintenu en surfusion à une température de 40 à 45°C. Après écoulement et solidification du mélange (milieu de culture et fongicide), des explants d'agar de 5 mm de diamètre, portant l'agent pathogène d'une culture jeune de sept (07) jours, ont été déposés au centre de boîtes de Petri. Ces boîtes sont incubées dans une étuve à une température de (20 ± 2°C) correspondant à l'optimum de croissance mycélienne de *A. rabiei* (Trapero-Casas et Kaiser, 1992). Le témoin est réalisé dans les mêmes conditions sans fongicide.

La croissance mycélienne de *A.rabiei* est évaluée en mesurant le diamètre de la colonie, calculé à partir de deux diamètres perpendiculaires les plus dissemblables, après 10 jours d'incubation. Le protocole expérimental est représenté dans le tableau ci-dessous (Tab.14). La vitesse de croissance est calculée en mm/j et comparée par rapport à celle du témoin. Le dispositif expérimental est illustré dans la figure ci-dessous (Fig.32).

Tableau 14. Protocole expérimental de l'essai.

Isolats	Nombre de repetition	Fongicides testés		Témoin
		Benomyl	Carbendazime	
MSC1	3	1.5g/l	0.5g/l	1
AT1	3	1.5g/l	0.5g/l	1
SB1	3	1.5g/l	0.5g/l	1
MOS1	3	1.5g/l	0.5g/l	1
REL1	3	1.5g/l	0.5g/l	1

**Figure 32:** Vue générale du dispositif expérimentale.

(R : Répétition • : Explant A : Isolat).

On obtient pour chaque traitement un taux d'inhibition de la croissance mycélienne et pour chaque isolat étudiée. Le taux d'inhibition (TI %) de la croissance mycélienne est évaluée en se basant sur la formule suivante :

$$TI (\%) = \frac{VT - VS}{VT} \times 100$$

Sachant que : **TI (%)** : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne en % ; **VT** : Vitesse de croissance du témoin et **VS** : Croissance de la souche de *A.rabiei* en présence du fongicide

3.5.2.2. Test *in vivo* de l'efficacité des fongicides sur folioles de *Cicer arietinum* L.

Les deux fongicides testés sont préparés pour l'inoculation des folioles de pois chiche à la dose homologuée (1.5 g/l pour le *Benomyl* et 0.5 g/l pour le *Carbendazime*) (Goowin, 2008), les colonies des isolats sont immergées dans l'eau distillée stérile puis grattées par une spatule de verre stérile. La suspension est ajustée à 5×10^5 conidies/ml à l'aide d'une cellule de numération

de Malassez. Pour le témoin, la suspension contient l'inoculum avec l'eau distillée stérile.

Les lignées de pois chiche (ILC482, F1025 et Col08) ont été désinfectées avec l'hypochlorite de sodium (2%) pendant 3 mn suivi avec 3 rinçages avec de l'eau distillée stérile. Le semis a été réalisé dans des pots de 10 cm x 6 cm contenant une tourbe stérile, à raison de 2 graines/pot. Après 15 jours, on enlève 4 à 5 folioles pour faire le test d'inoculation à raison de 3 folioles pour chaque traitement (Fig.33).

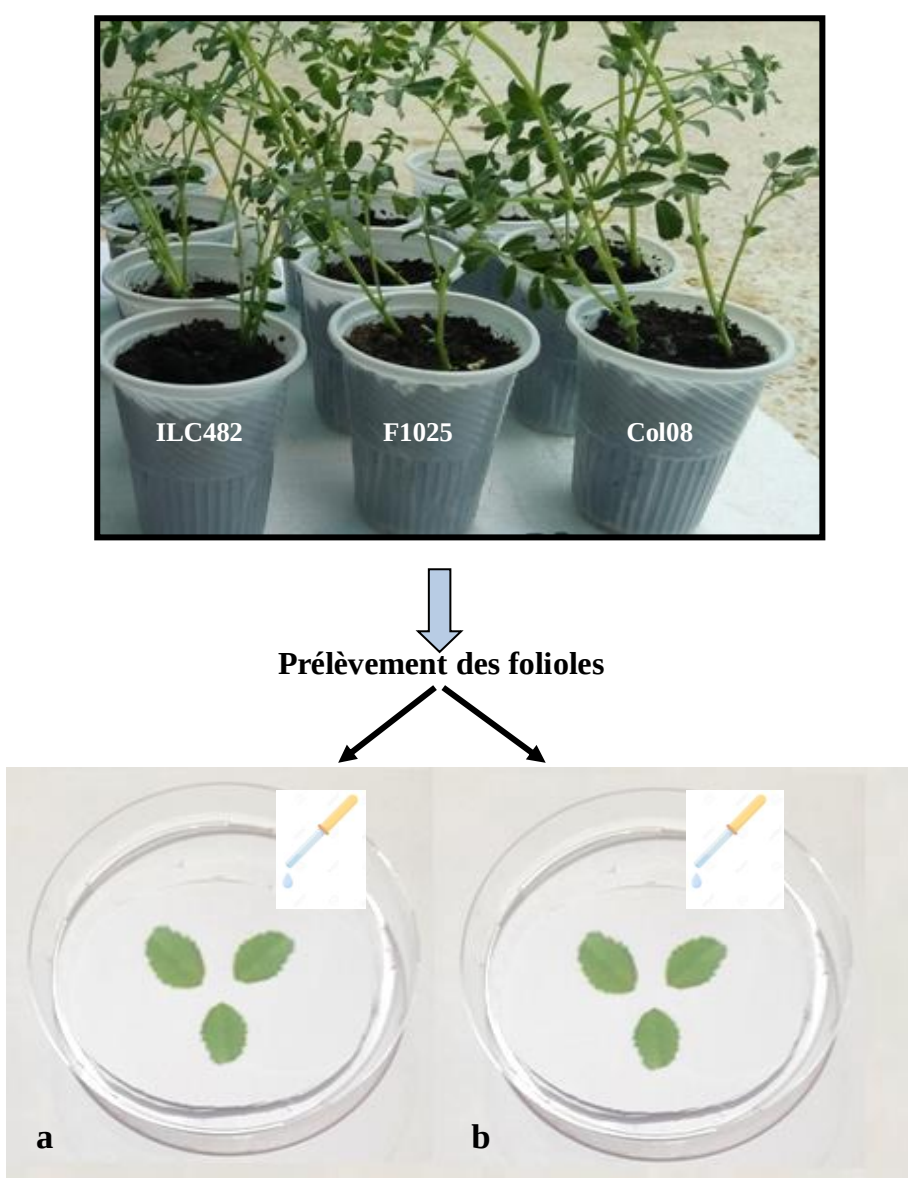


Figure 33 : Dispositif expérimental de l'inoculation des folioles de pois chiche par les isolats de *A.rabiei*. **(a)** : Témoin (inoculum seul) ; **(b)** : Traité (inoculum et fongicide) (ILC482).

a. Evaluation des symptômes

Les symptômes qui apparaissent sur les folioles sont notés 14 jours après l'inoculation selon une échelle de notation de 1 à 7 (Dolar, 1997) ci-dessous :

1 = Pas de symptômes 0%

3 = Nécrose sur 25 %

5 = Nécrose sur 50 %

7 = Nécrose sur 100 %

Cette échelle est basée sur le pourcentage de la surface de l'infection par rapport à la surface complète de la foliole. La classification des lignées sont comme suit (Dolar, 1997) :

➤ Lignées de 1.0 à 4.9 sont résistantes

➤ Lignées de 5.0 à 7 sont sensibles

b. Evaluation de la réduction de l'incidence de l'antracnose (IM en %)

On évalue l'incidence de la maladie selon les notations des symptômes par l'utilisation de la formule suivante:

$$\text{IM \%} = \frac{\sum (N \times \text{NFI})}{\text{NPE} \times \text{NTF}} \times 100$$

IM : Incidence de la maladie en %

N : Notations

NFI : Nombre des folioles infectées

NPE : Notation la plus élevée

NTF : Nombre totale des folioles

On calcule la réduction de la maladie (RIM en %) à l'aide de l'incidence de la maladie (IM) en utilisant la formule suivante :

$$\text{RIM \%} = \frac{\text{IMT} - \text{IMT}_0}{\text{IMT}} \times 100$$

RIM : Réduction de l'incidence de la maladie en %

IMT : Incidence de la maladie témoin en %

IMT₀ : Incidence de la maladie traitée en %

3.5.3. Traitement statistique

Le dispositif expérimental utilisé dans cet essai est la randomisation totale unifactorielle avec 4 répétitions, le facteur étudié est inhibition de croissance mycélienne représentée par le taux d'inhibition (%) et l'unité expérimentale est la croissance mycélienne (mm). L'analyse statistique est l'ANOVA (analyse de la variance) par le logiciel de StatBox 6.0.4 GrimmerSoft. Pour tous les tests, le niveau de signification a été évalué aux seuls 5% et 1%. Le cas échéant, la comparaison des moyennes est faite sur la base du test de Newmann-Keuls afin de distinguer des groupes homogènes selon les valeurs des moyennes des variables testées.

III.6. Identification moléculaire des isolats de *A.rabiei*

Le but de cette étude est basé sur la detection et l'identification de la souche de *Ascochyta rabiei* sur la culture de pois chiche à travers l'échantillonnage effectuée dans différentes régions de l'ouest algérien. L'identification moléculaire des isolats est réalisée par l'utilisation des amorces ITS (Espaceur transcrit interne) (ITS1 et ITS4) et la détermination de Mating types (MAT).

3.6.1. Culture et extraction du mycélium de *A. rabiei*

Nos 16 isolats sont incubés sur le milieu de culture (CSMDA dans des conditions ambiantes telles que la lumière alterné (12 h obscurité et 12 h lumière) et la température ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) pendant quatorze (14) jours. Pour chaque isolat, 10 explants de 1cm^2 sont prélevés à l'aide d'un scalpel puis ensemencés dans des fioles de 250 ml contenant le milieu de culture PDB (Potato Dextrose Growth, Difco. Après sept à dix jours d'incubation, la surface du milieu est recouverte par le mycélium. Ce dernier est récupéré par la technique de filtration à l'aide d'une pompe à vide. Après trois rinçage, le mycélium est séché à l'aide d'un papier filtre, puis enveloppé dans du papier aluminium et conservé pour une utilisation ultérieure (Vail et Banniza, 2009 ; Mahiout, 2017).

3.6.2. Extraction d'ADN génomique

Il existe plusieurs protocoles d'extraction d'ADN. Dans notre étude l'extraction d'ADN a été réalisée par l'utilisation du Kit Dneasy Mini Kit Plant de Qiagen (Qiagen USA). Disques (5

mm de diamètre) des isolats à spores uniques de *A. rabiei* ont été inoculés dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml de milieu de bouillon de dextrose de pomme de terre liquide (PDB, Difco). Après 7 jours sur un agitateur rotatif à 100 tr / min et 20°C, les mycéliums ont été récoltés dans les flacons par filtration à travers l'article Whatman n°1. Lyophilisé pendant 5 jours et conservé à 30 °C. Environ 0,05 g du mycélium lyophilisé a été transféré dans tubes de microcentrifugeuse et re-lyophilisés pour une journée. Le mycélium de chaque isolat a été broyé en une poudre fine à l'aide d'un batteur à perles. L'ADN peut être extrait à l'aide d'un protocole de mini préparation modifié utilisant le d'hexadécyltriméthyl-ammonium méthode au bromure (CTAB), tampon d'extraction en utilisant la méthode de (Chongo et *al.*, 2004; Vail et Banniza, 2009). La quantité et la qualité de l'ADN extrait a été évaluée en exécutant l'ADN sur gel d'agarose 1.25%, coloré au du bromure d'éthidium à 0,1 µg/ml. La visualisation des ADN est observée sous Ultra Violet (UV) et photographiés avec le Gel Doc de Biorad (Biorad USA). Les ADN extrait ont été dosés par Spectrophométrie (Nanodrop 2000, FisherScientific). L'ADN est conservé au congélateur à -20 °C.

3.6.3. Purification de l'ADN

L'ADN purifié est élué dans un tampon à faible teneur en sel ou d'eau, prêt à être utilisé dans les applications en aval. L'ADN purifié à l'aide de DNeasy Plant Kits a une taille allant jusqu'à 40 kb, avec des fragments de 20 à 25 kb prédominant. L'ADN purifié DNeasy a des rapports A260 / A280 de 1,7 à 1,9, et les balayages d'absorbance montrent un pic symétrique à 260 nm, confirmant une grande pureté.

L'ADN purifié à l'aide de DNeasy Plant Kits est parfaitement adapté à une utilisation en aval applications, y compris PCR, analyse d'ADN polymorphe amplifié aléatoire (RAPD), amplifié analyse du polymorphisme de longueur de fragment (AFLP), polymorphisme de longueur de fragment de restriction (RFLP) analyse, Southern blot, analyse microsatellite, polymorphismes mononucléotidiques (SNP) génotypage et PCR quantitative en temps réel.

Pour le protocole de purification de l'ADN, nous avons utilisé celui employé sur les cultures de champignons mycorrhiziens, adapté à la purification de l'ADN provenant des tissus fongiques et végétaux (Fig.34). Dans les procédures DNeasy Plant le matériel végétal est d'abord perturbé mécaniquement puis lysé par addition de tampon de lyse et incubation. La RNase A dans le tampon de lyse digère l'ARN dans l'échantillon.

Après la lyse, les protéines et les polysaccharides sont précipités par le NaCl. Dans les

procédures DNeasy 96, les débris cellulaires et les précipités sont éliminés par centrifugation. Dans les procédures DNeasy Mini et Maxi, les débris cellulaires et les précipités sont éliminés en une seule étape par une brève rotation à travers la colonne QIAshredder, une unité de filtration et d'homogénéisation unique. Un tampon de liaison et de l'éthanol sont ajoutés au lysat clarifié pour favoriser la liaison de l'ADN à la membrane DNeasy.

L'échantillon est ensuite appliqué sur une colonne de centrifugation DNeasy ou une plaque DNeasy 96, puis centrifugé. L'ADN se lie à la membrane, tandis que les contaminants tels que les protéines et les polysaccharides sont efficacement éliminés en 2 étapes de lavage.

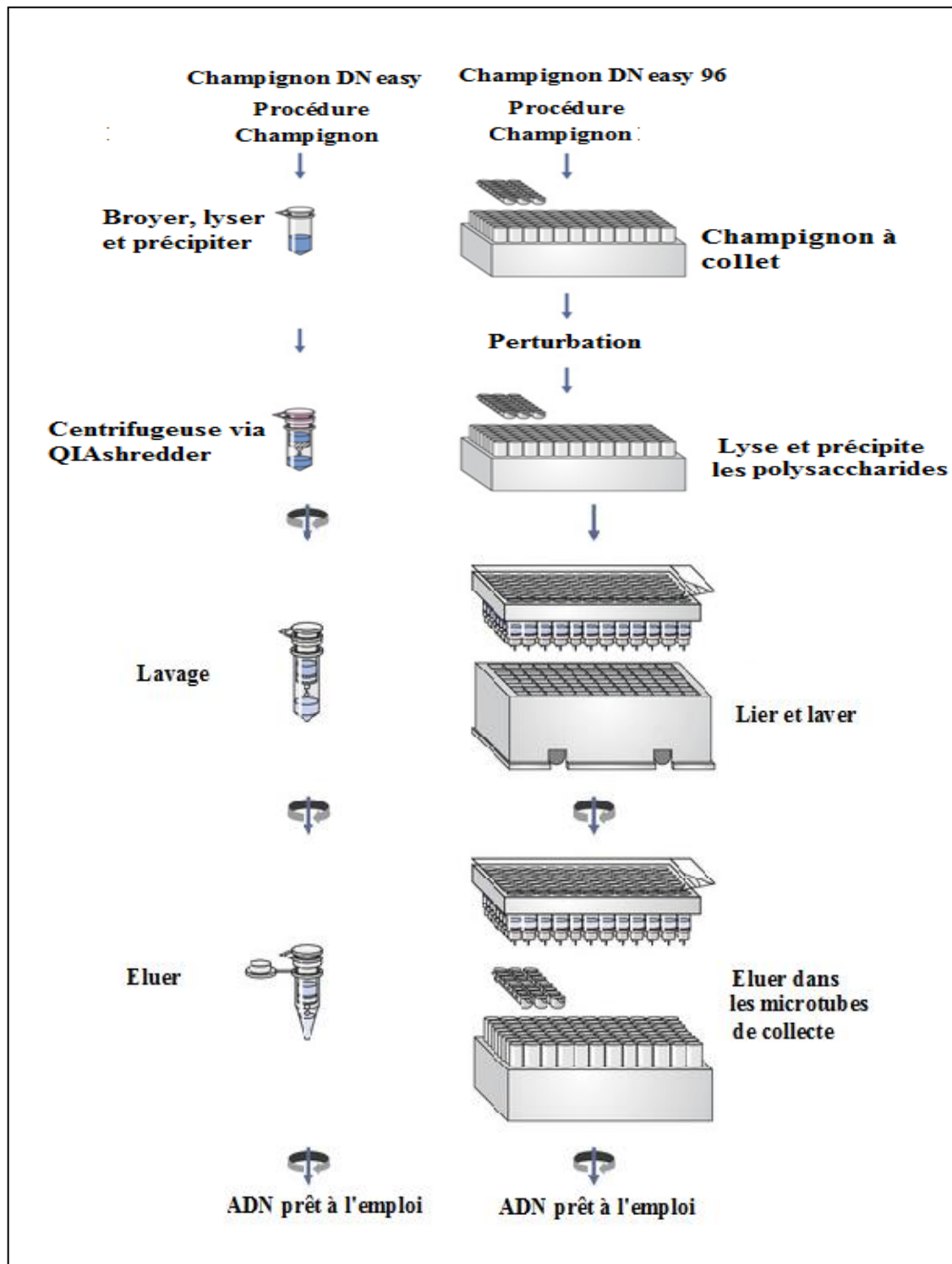


Figure 34 : Protocole expérimental de purification d'ADN (DNeasy plant handbook, 2020)

3.6.4. PCR multiplex pour l'ITS et les Mating types (MAT)

a. Principe de la PCR

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en

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

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

b. PCR et conditions de réalisation

Parmi les approches moléculaires en systématique des champignons, nous avons choisi celle basée sur l'analyse des séquences de l'ADN ribosomal. L'unité ribosomique, présente dans le génome de tous les organismes, est répétée en tandem chez les champignons. Les séquences de cette unité comprennent à la fois des régions variables et des régions conservées. Ainsi, la région ITS de l'ADN ribosomal est une zone assez conservée à l'intérieur d'une même espèce fongique mais elle est très variable d'une espèce à l'autre et constitue donc un bon outil taxonomique à l'échelle de l'espèce. Nous avons choisi d'amplifier par PCR la région ITS avec deux amorces universelles ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3') largement décrites par White et *al.* (1990).

c. Séquençage des régions ITS

Après vérification de la qualité de l'ADN par électrophorèse, les produits de PCR peuvent alors être séquencés. Le séquençage des fragments est réalisé par la plate-forme Beckman Coulter Genomics (Royaume Uni). Les acquisitions sont ensuite des analyses par comparaison avec des séquences existantes dans les bases de données (GenBank) à l'aide du

programme Blast du serveur NCBI (Fig.35).

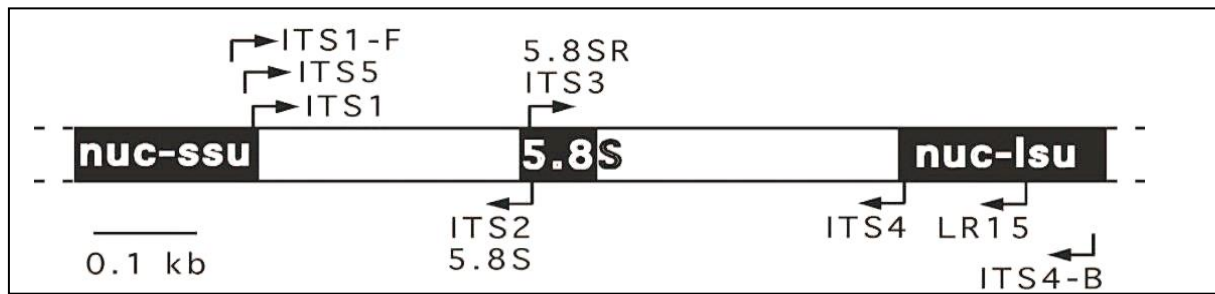


Figure 35 : l'arrangement des gènes et des séquences intergéniques nucléaires dans la région d'ADNr et la localisation des ITS1 et ITS4 (Ndir, 1998).

d. Identification des Mating types

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

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

e. PCR et conditions de réalisation pour l'ITS et Mating type

La technique PCR développée par Barve et *al.* (2003) est utilisée pour identifier rapidement les groupes de Mating type de *A. rabiei* (Rhaim et *al.* 2007). Le type mating type de chaque isolat a été déterminé en utilisant le test de PCR spécifique MAT. Trois amorces spécifiques ont été utilisés en PCR multiplex MAT, amorce1 SP21F (ACAGTGAGCCTGCACAGTTC), amorce 2 Tail5F (CGCTATTTTATCCAAGACACACC) et amorce3 spécifique à la région Com1R (GCATGCCATATCGCCAGT) ont été combinés en concentrations égales dans un PCR unique (Barve et *al.*, 2003). Les amplifications PCR multiplex MAT ont été réalisées dans une réaction de 25 µl volume contenant Tanpom Taq polymérase Propega 5µl, Mg Cl₂ 25 mM, Taq Hot start Promega 0.3µl, Eau ultra pure 12µl, 0,2 µl dNTP et 2 unité d'ADN Taq polymérase (Annexe 06). La concentration d'ADN fongique était de 2 µg/ml pour régions ITS et 4 µg/ml pour le locus de Mating type. Apprêt les concentrations

étaient de 0,2 μ M pour ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) et ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) et 0,4 μ M pour les amorces Mating type Tail5F (CGCTATTTTATCCAAGACACACC), Com1R (GCATGCCATATCGCCAGT) et SP21F (ACAGTGAGCCTGCACAGTTC) comme décrit par Barve et *al.*, 2003. Les amplifications ont été effectuées dans un thermocycleur avec une étape initiale de dénaturation pendant 12 min à 95°C, suivi de 38 cycles pour les amorces ITS et 45 cycles pour amorces de Mating type de 30 s à 95°C, 1 min au recuit température, 1 min à 72°C, avec une extension finale pour 5 min à 72 °C jusqu'à révélation à 4°C (Annexe 07). La température de recuit était de 50 °C pour ITS et 58°C pour les primaires de Mating type. Les produits PCR Multiplex Mating types ont été séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose 1,25% et colorés au du bromure d'éthidium à 0,1 μ g/ml. La visualisation des ADN est observée sous Ultra Violet (UV) et photographié avec le Gel Doc de Biorad (Biorad USA). Les produits de PCR des régions ITS ont été séquencés avec les amorces universelles ITS1 et ITS4 de Beckman Coulter Génomique (Angleterre) (Fig.36). Les valeurs du chi carré pour la qualité unidimensionnelle du fittest avec un niveau de confiance de 95% ont été calculées pour tester un rapport 1: 1 des fréquences MAT dans tous les échantillons, La probabilité d'une plus grande valeur du chi carré sous l'hypothèse nulle d'un rapport 1: 1 de proportions égales de MAT avec reproduction sexuée a également été calculée (Annexe 8) (Atik, 2011 et Bowley, 1999).

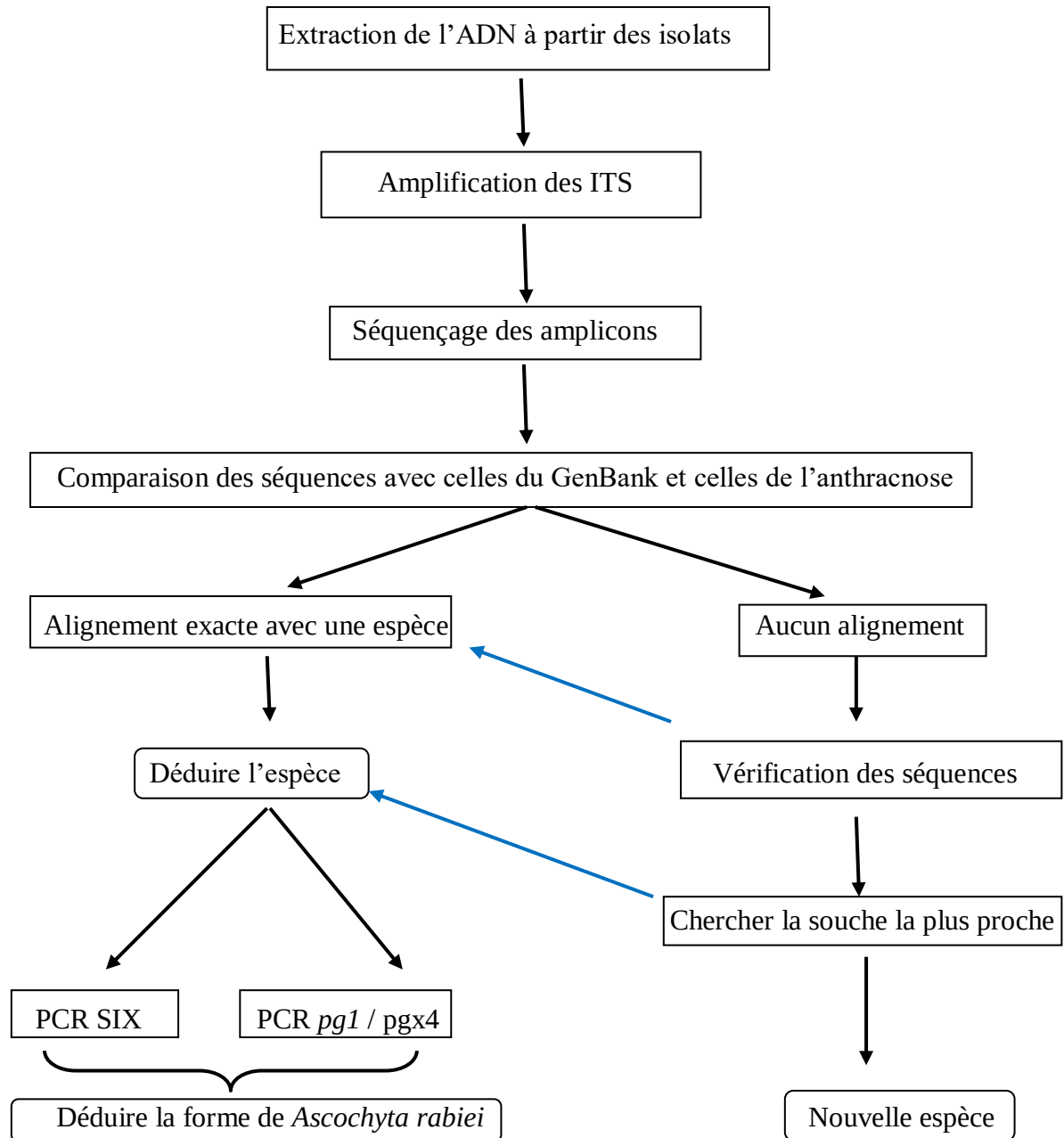


Figure 36. La méthodologie choisie pour la caractérisation moléculaire des isolats.

Chapitre IV :
Résultats et Discussions

Chapitre IV: Résultats et Discussions

IV.1. Prospections sur terrain

Pour le dépistage de l'anthraxose, des prospections ont été effectuées au niveau des parcelles de pois chiche dans cinq (05) régions de l'ouest algérien. Des symptômes typiques (nécroses) de la maladie ont été observés dont l'importance diffère d'une parcelle et d'une région à une autre (Fig 37).

▪ **Wilaya de Mascara:** La maladie a été mise en évidence dans trois communes à savoir Maoussa, Tighennif et Sidi kada avec différents pourcentages d'attaque qui varient de 15.8 %, 14.2 % et 10% respectivement sur 8 ha de la superficie totale emblavée.

▪ **Wilaya de Sidi Bel Abbès:** Des symptômes caractéristiques de la maladie de l'anthraxose de pois chiche ont été observés au niveau de 11 ha réparties sur quatre localités des régions de Tassala, Sidi Lahcene, Attouche et INRASBA et dont le taux d'attaque varie de 12%, 11.4, 10.6 % et 9 % respectivement.

▪ **Wilaya de Mostaganem:** Les prospections effectuées sur une superficie totale de 10 ha ont révélées la présence des symptômes typiques de la maladie au niveau de trois communes en l'occurrence Sidi Ali, Sidi Lakhdar et Achacha avec un pourcentage qui varie entre 9.72 %, 7.5% et 7.4% respectivement .

▪ **Wilaya de Ain Témouchent :** Sur une superficie de 10 h répartie sur trois communes à savoir Hassi El Ghalla, Beni saf et Kihal, l'importance de la maladie diffère d'une localité à une autre soit 5.42%, 5.20% et 4.7 % respectivement.

▪ **Wilaya de Relizane:** Trois zones avec une superficie de 5 ha ont été prospectées et qui ont révélé la présence de l'anthraxose dans les communes de Mendes, Yellel et Beni Dergane avec un taux d'attaque qui varie de 5.33 %, 5.5% et 6.75% respectivement

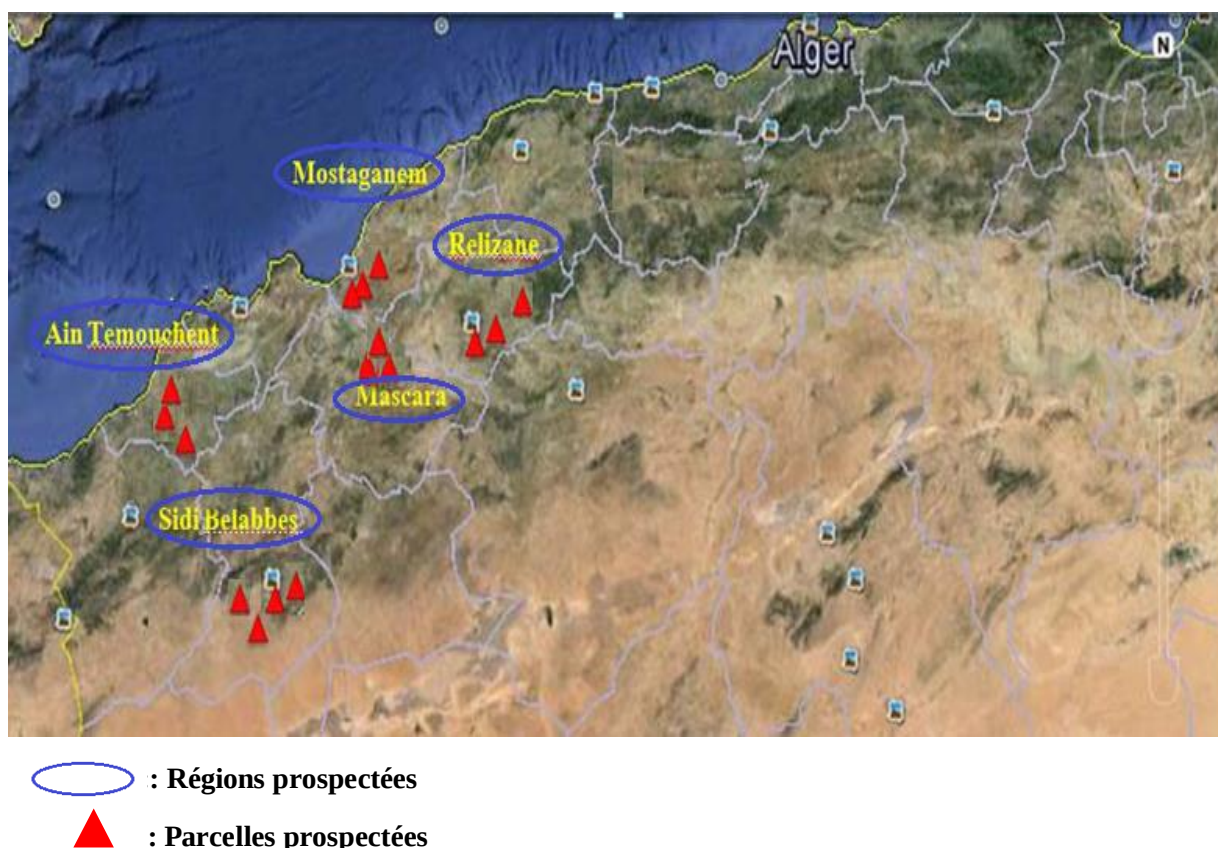


Figure 37 : Dépistage de l'anthraxose de pois chiche dans les régions prospectées.

En général le semis de pois chiche est pratiqué dans la zone d'étude en hiver entre le mois de Décembre et Janvier, Quant au semis du printemps, ce dernier est réalisé en mois de Mars. Les variétés de pois chiche utilisées sont des variétés locales qui diffèrent selon leur densité de semis.

L'enquête menée auprès des agriculteurs a montré que la culture de pois chiche est introduite dans les programmes d'assolement dans toutes parcelles prospectées.

Il est à noter que dans l'ensemble des parcelles, aucun traitement phytosanitaire et irrigation ne sont appliqués. La fertilisation ne constitue qu'un facteur supplémentaire pour l'ensemble des régions. Aussi, une fourniture équilibrée et adéquate de nutriments augmente la capacité de la culture à tolérer des stress abiotique et biotique et améliorer la résistance physiologique (Gan et *al.*, 2006).

La totalité des agriculteurs pratiquent la rotation agricole, dont la culture de pois chiche est indispensable et qui varie entre une (01) et deux (02) ans. Les cultures placées

dans cette rotation sont essentiellement les céréales (blé et avoine, etc...), les légumineuses (petit pois, fève et lentille, etc...) et parfois les cultures maraichères (l'oignon, etc...). Après la récolte, les agriculteurs ont en foui les débris de récolte dans le sol.

La maladie la plus fréquente sur culture de pois chiche est l'antracnose. Cette dernière a été signalée au stade floraison et plantule (prématuration) selon la région prospectée et la durée de semi (Fig.38). Les symptômes ont été observés pendant les différents stades phénologiques (plantule – ramification – floraison – maturité) et à des degrés d'infection variables. Ces observations se rapprochent de ceux signalés par Chongo et Gossen (2001) et Ilarslan et Dolar (2002). De plus, l'incidence et la sévérité de la maladie varient d'une parcelle à une autre dans chaque site.



Figure 38 : Parcelles de pois chiche prospectées (Sidi Ali-Mostaganem)
A : Dégâts de l'antracnose de pois chiche ; **B :** Lésions nécrotiques sur gousses par *Ascochyta rabiei* (Original, 2016).

4.1.1 Evaluation de l'incidence de la maladie.

L'incidence moyenne de la maladie est de 29.40%. La région de Mascara présente le taux le plus élevé avec 46.68%, suivi de Sidi Bel Abbès (38.5%), la région de Relizane (26.5%) et enfin Mostaganem et Ain Témouchent avec un taux de 18.67% et 13.63% respectivement (Fig.39 et 40, Annexe 9).

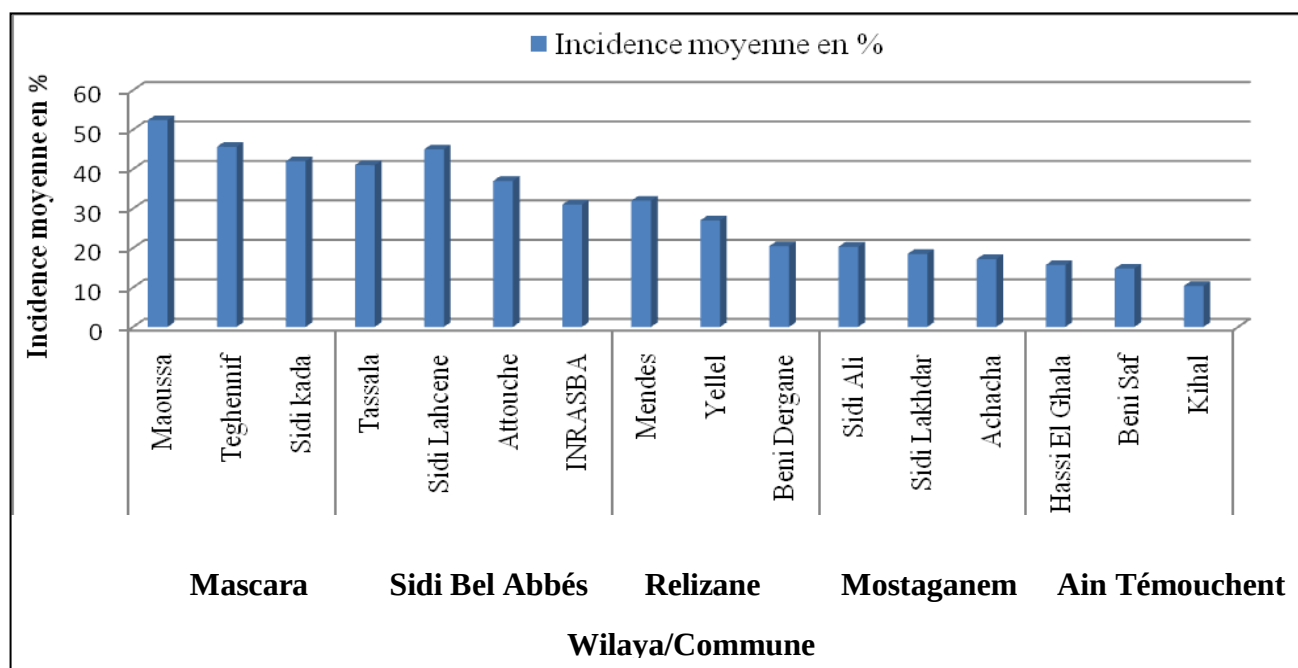


Figure 39: Incidence moyenne de l'antracnose du pois chiche durant la campagne agricole 2015-2016

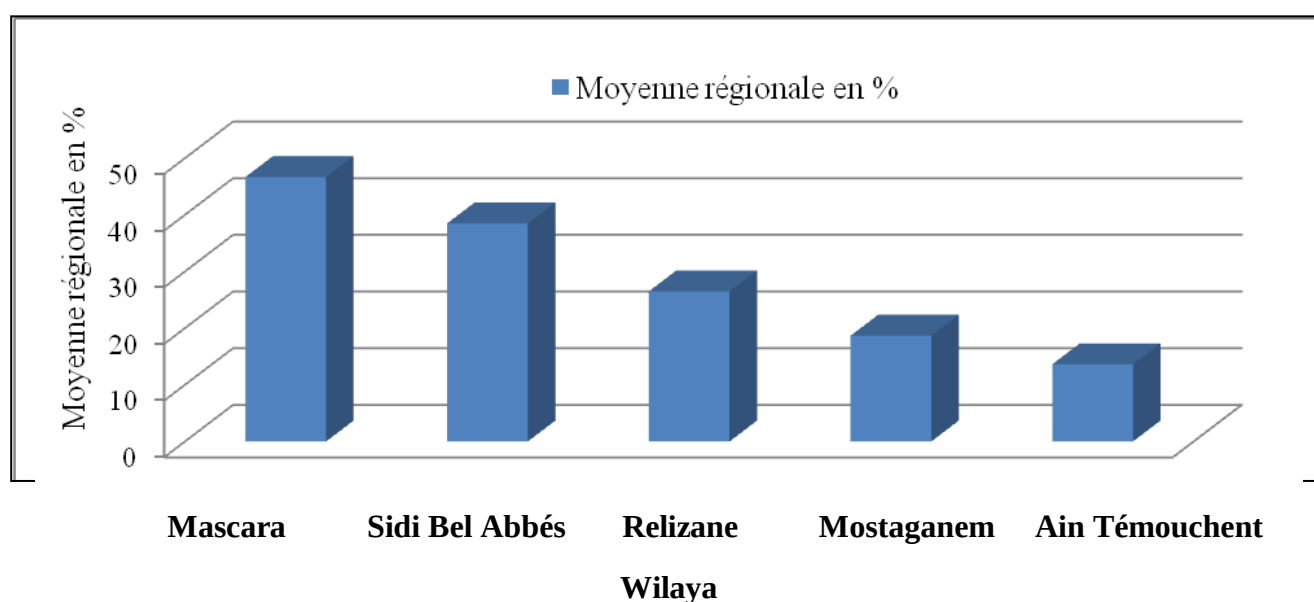


Figure 40: Moyenne régionale (en %) de l'incidence de l'antracnose du pois chiche durant la campagne agricole 2015-2016

La sévérité de la maladie selon l'échelle de Reddy et Singh (1984), varie d'une parcelle à une autre, entre 1.5 et 4.9 avec une moyenne de 4.10. Ainsi, les parcelles de Mendes, Yellel, Beni Dergane Sidi Ali, Hassi El Ghalla, Achacha, Sidi Lakhdar, Kihal, Beni Saf, Tassala, Sidi Lahcene, Attouche et INRASBA sont résistantes à la maladie, les parcelles

de Maoussa, Teghennif et Sidi kada sont tolérantes à modérément sensibles (Fig.41. Annexe 10).

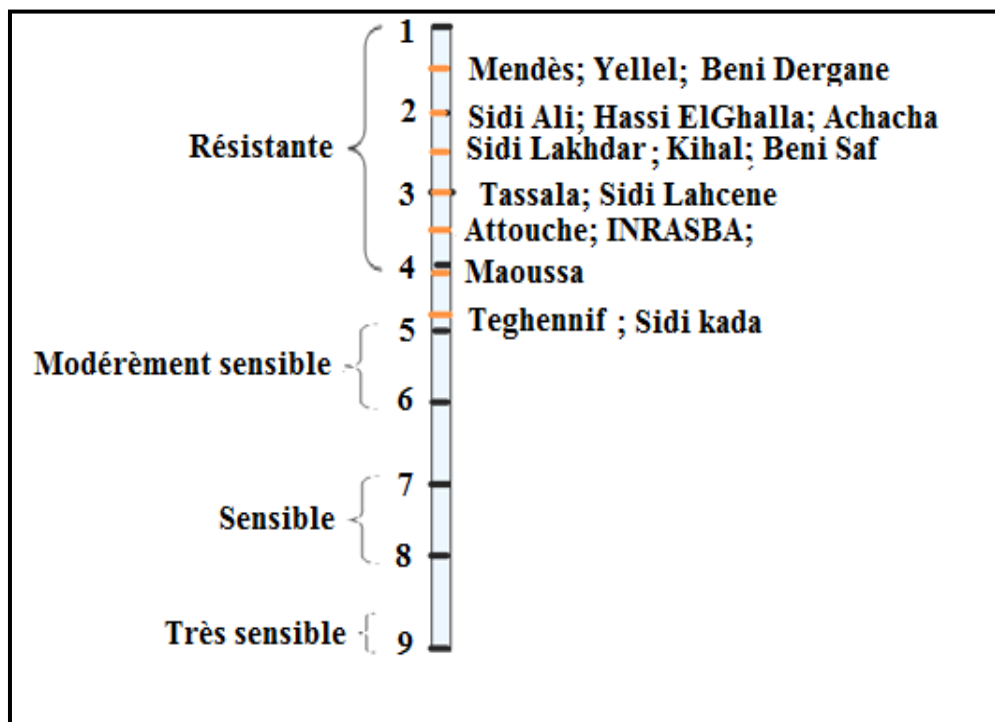


Figure 41. La sévérité moyenne de la maladie

4.1.2 Discussion

Selon Andrabi et *al.* (2001), les facteurs climatiques tels que l'humidité et la température jouent un rôle important dans la propagation de l'antracnose du pois chiche à côté de leurs effets déterminants dans la transmission et l'évolution de la maladie.

Les semences infectées peuvent être un moyen de transport de l'agent pathogène d'une région à une autre (Sidique et Bultynck, 2004). Généralement les conditions climatiques dans les régions prospectées sont caractérisées par une pluviométrie dont la moyenne varie entre 250 et 300 mm selon la région et des températures élevées moyennes d'environ 19°C durant la campagne agricole 2015-2016.

La sévérité de l'antracnose est plus importante dans deux régions (Mascara et Sidi Bel Abbès) où il y a des parcelles adjacentes irriguées, ce qui favorise les conditions de développement et l'évolution de la maladie.

La date de semis optimale permet aux plantes de maximiser l'utilisation des ressources

disponibles et être soumis à moins de contraintes (Sidique et Bultynck, 2004).

La majorité des agriculteurs questionnés ont pratiqué le semis d'hiver. En effet, les régions de Relizane, Mostaganem et Ain Témouchent présentent le taux d'incidence et la sévérité les plus faibles comparativement aux autres régions prospectées (Mascara et Sidi Bel Abbès). La culture du pois chiche d'hiver se développe dans des conditions humides et elle est exposé à la période de libération des ascospores apartir des débris de pois chiche infectés (Gan et *al.*, 2006).

La densité de semis peut avoir un impact sur la sévérité de la maladie car la densité élevée crée des conditions favorables au développement de la maladie (Sidique et Bultynck, 2004). Effectivement, les semis de pois chiche a faible densité donne une culture saine indemne de maladie (Aken, 2001).

Le stade végétatif de la plante et les résidus de culture peuvent affectent l'expression de la maladie des plantes cultivées (Gan et *al.*, 2006). Durant nos prospections, les symptoômes de l'anthracnose ont été observées aux différents stades phénologiques (ramification, floraison et pré-maturation) dans toutes les parcelles prospectées.

Certains auteurs ont rapporté que la culture de pois chiche devenait plus sensible à *A.rabiei* après la floraison et au stade pré- maturation (Labdi et *al.*, 1998), alors que Chongo et Gossen (2001) ont mentionné que le stade gousse était plus sensible que la stade plantule.

Les résultats de l'enquête in-situt nous ont permis de confirmer la sensibilité de la culture de pois chiche à l'anthracnose. L'incidence et l'évolution de la maladie varie en fonction des facteurs liées à la culture, la sévérité du pathogène et les conditions climatiques (l'humidité et la température).

IV.2 Caractérisation culturelle et morpho-biométrique de *A.rabiei*

4.2.1. Isolement de *A.rabiei*

L'isolement du champignon à partir des fragments de tiges et gousses des plantes infectées de pois chiche a révèle la présence des souches fongiques crémeuses avec faible vitesse de croissance, présentant des zonations typiques de *Ascochyta rabiei* (Fig.42).

L'observation microscopique des isolats, montre la présence des pycnides ainsi que les deux types des pycnidiospores (monocellulaire et bicellulaire) caractéristique du parasite.

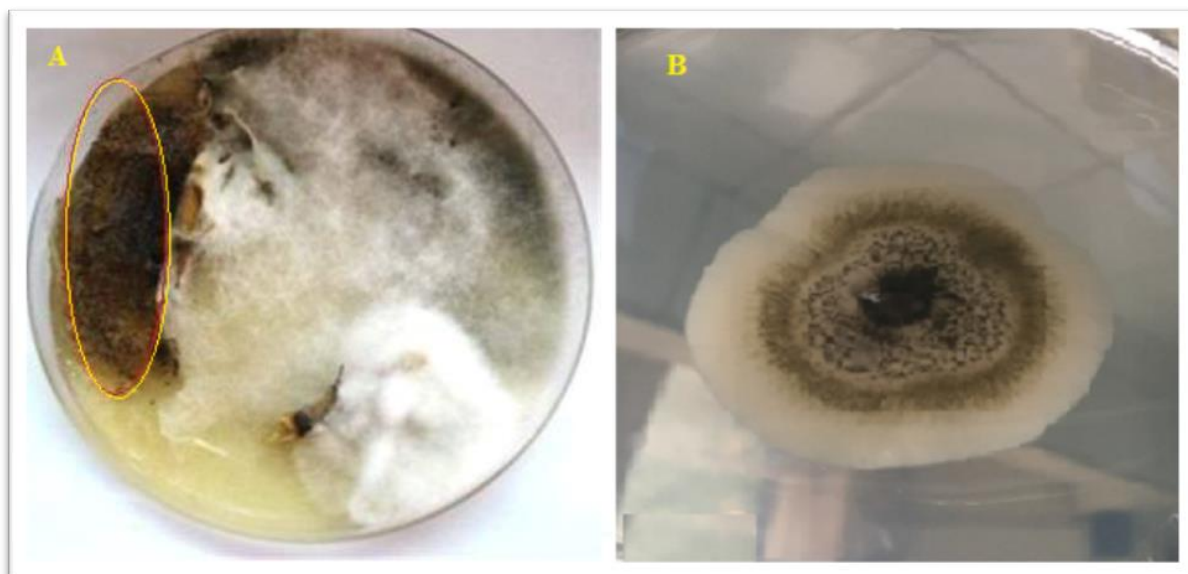


Figure 42. . Aspects culturels des isolats de *Ascochyta rabiei* sur milieu de culture CSMDA. **A** : Aspect général des isolats (MSC3) ; **B** : Isolot avec apparition des pycnides (originale ; 2016).

4.2.2. Variabilité culturelle, morphologique et biométrique de *A. rabiei*

4.2.2.1 Critères macroscopiques

La mise en culture de *A. rabiei* sur le milieu CSMDA et sous les conditions favorables pour son développement cité ci-dessus, nous a permis de mettre en évidence certaines différences macroscopiques entre les seize isolats du champignon (Tab.15, Fig.43).

L'aspect des cultures est variable selon les isolats, elle diffère par la couleur des colonies, l'abondance du mycélium, la couleur des pycnides et des cirrhes.

La couleur des colonies de tous les isolats varie du vert clair à vert olive. Des différences dans l'apparence du mycélium ont été observées, les isolats MSC2, AT3, MOS3, REL1 et REL2 présentent un mycélium aérien (relief), entre peu et très abondant, érigé qui donne aux colonies l'aspect rasant, il y a aussi du mycélium rasant (plat), très abondant pour d'autres isolats à l'exception de l'isolat MSC3, SB4 et MOS1 un mycélium peu abondant.

Des différences significatives dans la vitesse de croissance des isolats de *A. rabiei* ont été enregistrées. La croissance mycélienne varie selon l'isolat.

Effectivement, les isolats MOS2, REL1 et MOS1 ont une croissance mycélienne plus élevée par rapport aux autres isolats (20,01mm/j, 18,76 mm/j et 17,04mm/j, respectivement). En général, la croissance mycélienne des isolats varie entre 12,25 mm/j et 20,01 mm/j

(Annexe 11). La croissance mycélienne augmente lentement lorsque la température est supérieure à 25°C. La couleur du cirrhe libéré par les conidies matures montre une certaine variation de couleur, l'isolat MOS1 et MOS3 ont un cirrhe de couleur saumon. En conséquence, l'isolat MSC1 et AT3 se distingue par un cirrhe blanc sale. En revanche, les autres isolats ont une couleur marron.

Tableau 15 : Critères macroscopiques des seize (16) isolats de *A. rabiei*, 15 jours après leur culture sur milieu CSMDA. pH = 5,8

Isolats	Critères macroscopiques				
	Couleur des colonies	Aspect du mycélium	Abondance des pycnides	Couleur des cirrhes	Croissance mycélienne (mm/j)
MSC1	Vert olive	Rasant	+++	Blanc sale	13,21
MSC2	Vert olive	Aérien	+++	Marron	15,18
MSC3	Vert claire	Rasant	+	Marron	12.55
AT1	Vert claire	Rasant	+++	Marron	15.07
AT2	Vert olive	Rasant	++	Marron	16,25
AT3	Vert claire	Rasant	++	Blanc sale	11.35
SB1	Vert olive	Rasant	+++	Marron	14,86
SB2	Vert clair	Rasant	+++	Marron	16,26
SB3	Vert olive	Rasant	+++	Marron	14.20
SB4	Vert claire	Rasant	+	Marron	15,20
MOS1	Vert olive	Rasant	+	Saumon	17,04
MOS2	Vert clair	Rasant	++	Marron	20,01
MOS3	Vert claire	Rasant	++	Saumon	15.50
REL1	Vert olive	Aérien	+++	Marron	18,76
REL2	Vert clair	Aérien	++	Marron	14,50
REL3	Vert olive	Rasant	+++	Marron	12.25

+ : Peu abondant, ++ : abondant, +++ : Très abondant

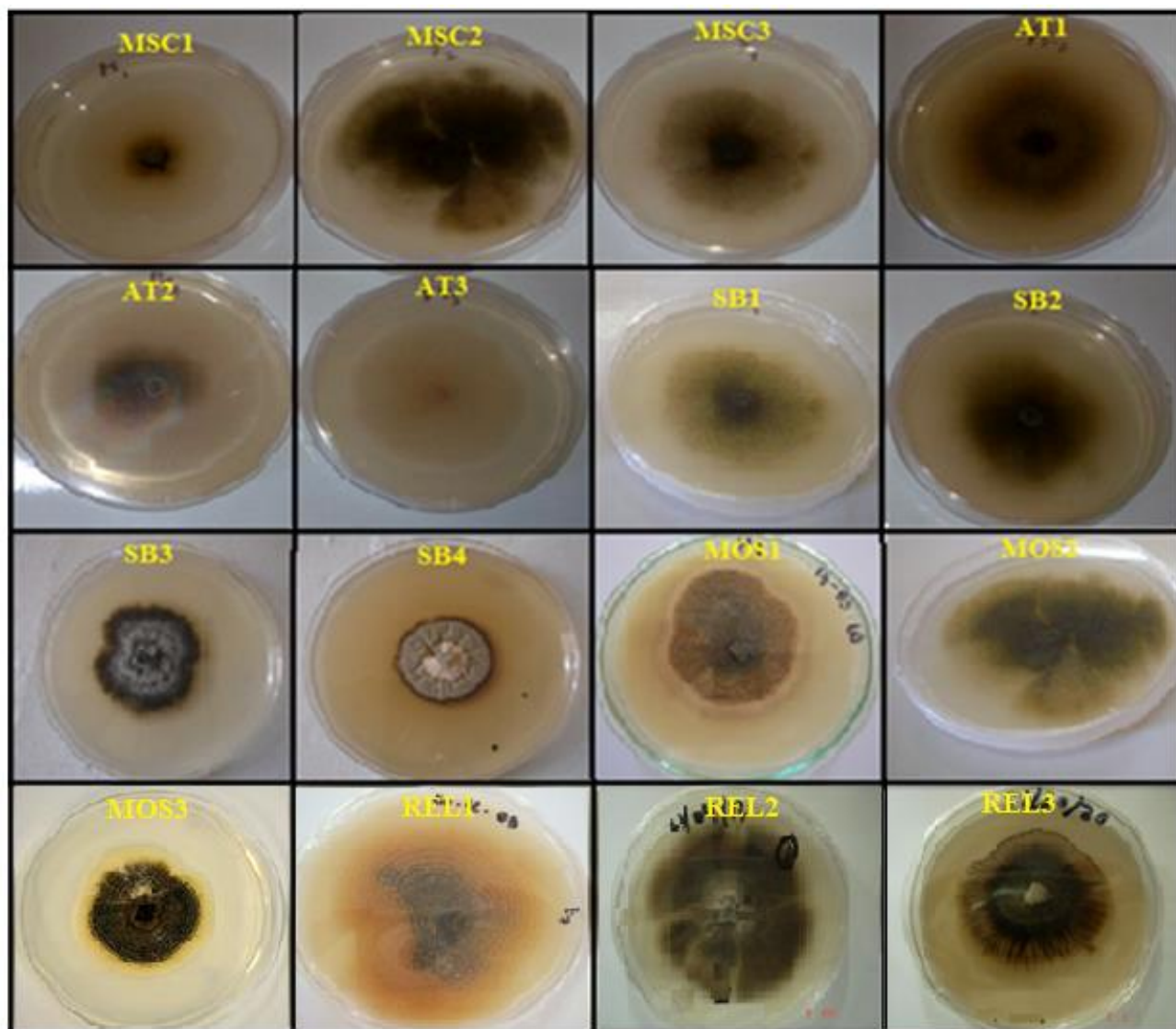


Figure 43 : Aspects culturels des isolats de *A.rabiei* sur milieu de culture CSMDA sous les conditions (Température de 20 ± 2 °C et 12 heures de photopériode).

4.2.2.2 Critères microscopiques

L'étude a révélé la présence des différences entre les seize isolats de *A. rabiei*. Différentes moyennes du taux de sporulation ont été observées sur le milieu CSMDA ainsi que des différences dans la couleur des pycnides.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 16 où nous remarquons que la couleur des pycnides varie du brun, du brun foncé au noir, selon l'isolat.

L'observation au microscope optique nous a permis d'observer des pycnides arrondies au grossissement x40, au grossissement x 100: l'ostiol chez les jeunes pycnides n'est pas

visible, mais chez les pycnides matures il est bien différencié. A maturité, les pycnides libèrent de leurs ostioles des pycnidiospores hyalines noyées dans une masse mucilagineuse (cirrhe).

Les pycnidiospores sont ovales ou légèrement allongées, généralement unicellulaires et parfois bicellulaires. Les mesures des conidies des isolats de *A. rabiei* étaient sur la longueur et sur la largeur allant respectivement de 5,13 x 16 µm à 2,22 x 7,55 µm, selon l'isolat. Les mesures conidiales des isolats et leurs intervalles de mesure sont indiqués dans le tableau 16.

Il est à noter que l'isolat MSC3 a la moyenne la plus élevée (15,55 µm de longueur et 7,55 µm de largeur). Les conidies sont hyalines, cylindriques et arrondies. La comparaison du taux de sporulation des isolats de *A. rabiei* a également montré des différences significatives, l'isolat SB1 a un nombre de sporulation plus faible ($2,25 \times 10^5$ spores/ml).

Le nombre de conidies varie de $2,25 \times 10^5$ spores/ml (SB1) à 12×10^5 spores/ml (REL1), et les isolats MSC1, MSC2, MSC3, AT1, AT2, AT3 et SB4 produisent une moyenne de spores (4×10^5 spores/ml ; $4,5 \times 10^5$ spores/ml ; 5×10^5 spores/ml ; $5,25 \times 10^5$ spores/ml ; $5,25 \times 10^5$ spores/ml ; $5,5 \times 10^5$ spores/ml et $5,5 \times 10^5$ spores/ml) respectivement, et pour les isolats restants, REL3, SB2, SB3, MOS3, REL2, MOS1, MOS2 et REL1 produisent un nombre de spores élevé ($7,5 \times 10^5$ spores/ml, $7,25 \times 10^5$ spores/ml, $7,5 \times 10^5$ spores/ml, $7,5 \times 10^5$ spores/ml, $8,5 \times 10^5$ spores/ml et $8,75 \times 10^5$ spores/ml, $9,2 \times 10^5$ spores/ml et 12×10^5 spores/ml) respectivement (Tab. 16, Fig.44. Annexe 11).

Tableau 16: Critères microscopiques de seize (16) isolats de *A. rabiei*, 15 jours après leur culture sur milieu CSMDA, pH = 5,8

Isolats	Couleur des pycnides	Nombre de spores/ml	Critères microscopiques		Intervalle de mesure
			Taille des conidies (µm)		
			Largeur moyenne	Longueur moyenne	
MSC1	Noir	$4 \cdot 10^5 \pm 2445,1$	5.45	12.45	(3.8-7.5) x (7.99 -15.6)
MSC2	Brun	$4,5 \cdot 10^5 \pm 51104$	4.72	14.25	(2.22-6.5) x (6.45-16)
MSC3	Brun	$5 \cdot 10^5 \pm 4110,1$	7.55	15.55	(2.5-5.5) x (5.45-15)
AT1	Noir	$5,25 \cdot 10^5 \pm 3251$	5.25	12.23	(4.4-6.12) x (5.13-15.2)
AT2	Noir	$5,25 \cdot 10^5 \pm 2252$	5.25	14.23	(5.4-7.12) x (5.13-16)
AT3	Brun	$5,5 \cdot 10^5 \pm 3251$	5.25	15.25	(5.4-5.12) x (4.5-14.5)
SB1	Noir	$2,25 \cdot 10^5 \pm 6211$	5.33	14.15	(4.15-6.14) x (5.56-15)
SB2	Brun foncé	$7,25 \cdot 10^5 \pm 5341,6$	6.25	14.34	(3.55-7.55) x (7.25-15.5)
SB3	Noir	$7,5 \cdot 10^5 \pm 1402$	5.72	12.75	(3.55-6.3) x (7.5-13.45)
SB4	Brun	$5,5 \cdot 10^5 \pm 2202$	5.55	14.75	(4.55-5.3) x (5.5-14.5)
MOS1	Brun	$8,75 \cdot 10^5 \pm 1520,4$	5.66	10.14	(3.12-5.7) x (5.58-14.5)
MOS2	Noir	$9,2 \cdot 10^5 \pm 3384$	6.52	10.33	(4.12-7.17) x (5.58-14.5)
MOS3	Brun	$7,5 \cdot 10^5 \pm 2520,2$	4.45	12.14	(4.45-5.25) x (5.5-15.5)
REL1	Brun	$12 \cdot 10^5 \pm 5182$	6.25	14.75	(4.42-6.33) x (7.5-16.2)
REL2	Brun foncé	$8,5 \cdot 10^5 \pm 4251.2$	4.23	12.45	(3.24 -5.12) x (5.4-14.5)
REL3	Brun	$6,5 \cdot 10^5 \pm 2250.2$	5.25	14.45	(4.24 -5.25) x (5.45-15.5)

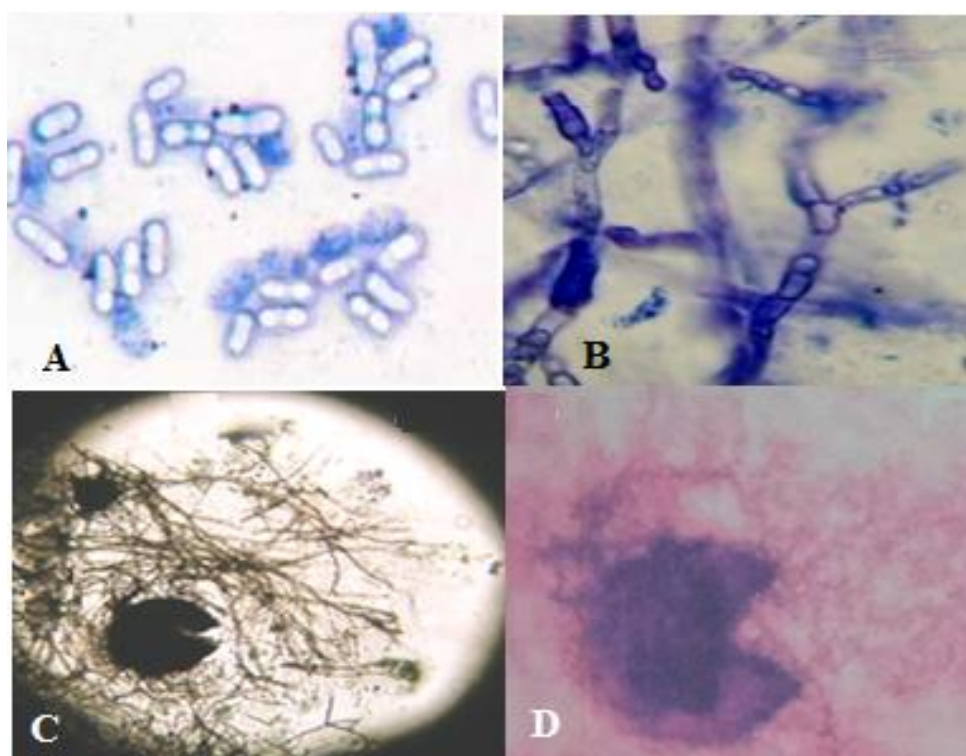


Figure 44 : Aspect microscopique de *Ascochyta rabiei* (Originale, 2017) ;
A: Pycnidiospores (GX40); **B:** Mycélium cloisonné (GX40); **C:** Pycnide (Gx10) ; **D :** Pycnides éclatées et pycnidiospores (GX40).

L'étude statistique des différents critères macroscopiques et microscopiques

(croissance mycélienne, sporulation et taille des conidies) nous a permis d'obtenir les meilleurs résultats (analyse de variance, test de Newman-Keuls = 5%) (Tab.17. Annexe 12).

Tableau 17 : Analyse de variance de la croissance mycélienne, de la sporulation et de la taille des conidies (Test de Newman-Keuls- Seuil = 5%) (Culture de 15 jours)

Isolats	Croissance mycélienne (mm)		Sporulation (x10 ⁵ spores /ml)		Taille des conidies (μm)	
	Moyenne	Test F	Moyenne	Test F	Longueur	Largeur
MSC1	13,21 ^f ± 1,023	29,5 ^{**}	4 ^g ± 2445,1	46 ^{**}	12,45 ^{cf} ± 1,33	5,45 ^{cd} ± 0,12
MSC2	15,18 ^{cd} ± 2,125	22 ^{**}	4,5 ^f ± 51104	25,25 [*]	14,25 ^{cd} ± 1,05	4,72 ^e ± 0,15
MSC3	12,55 ^{fg} ± 1,025	25 ^{**}	5 ^{ef} ± 4110,1	23,22 [*]	15,55 ^a ± 1,25	7,55 ^a ± 0,05
AT1	15,07 ^{cd} ± 1,082	14 [*]	5,25 ^e ± 3251	20,13 [*]	12,23 ^f ± 1,14	5,25 ^d ± 0,25
AT2	16,25 ^b ± 2,014	19 ^{**}	5,25 ^e ± 2252	24,15 [*]	14,25 ^{cb} ± 1,02	5,25 ^d ± 1,12
AT3	11,35 ^h ± 1,011	18 [*]	5,5 ^{de} ± 1352	28,25 ^{**}	15,25 ^{ab} ± 1,04	5,25 ^d ± 1,33
SB1	14,86 ^d ± 2,785	15,15 [*]	2,25 ^f ± 6211	14,17 [*]	14,15 ^d ± 1,5	5,33 ^d ± 0,12
SB2	16,26 ^c ± 2,614	35 [*]	7,36 ^{cd} ± 5341,6	52,12 ^{**}	14,34 ^{cd} ± 1,22	6,25 ^{bc} ± 0,21
SB3	14,20 ^e ± 3,415	22,5 [*]	7,5 ^{cd} ± 1402	55,017 ^{**}	12,75 ^e ± 2,26	5,72 ^c ± 0,01
SB4	15,20 ^c ± 1,282	20,5 ^{**}	5,5 ^{de} ± 2202	25,12 ^{**}	14,75 ^b ± 1,02	5,55 ^c ± 1,01
MOS1	17,04 ^a ± 1,015	62 ^{**}	8,75 ^c ± 1520,4	114,13 ^{**}	10,14 ^g ± 2,01	5,66 ^c ± 0,12
MOS2	20,01 ^a ± 1,713	44 [*]	9,2 ^b ± 3384	72,21 ^{**}	10,33 ^g ± 2,15	6,52 ^b ± 0,17
MOS3	12,14 ^g ± 1,125	23 [*]	7,5 ^{cd} ± 2520,2	52,11 ^{**}	12,14 ^f ± 1,16	4,45 ^e ± 0,14
REL1	18,76 ^b ± 5,011	17 ^{**}	12 ^a ± 5182	55,22 [*]	14,75 ^b ± 2,53	6,25 ^{bc} ± 0,19
REL2	14,50 ^{de} ± 2,114	12 [*]	8,5 ^c ± 4251,2	65,03 ^{**}	12,45 ^{cf} ± 2,17	4,23 ^{ef} ± 0,21
REL3	12,25 ^e ± 1,022	20 [*]	6,5 ^d ± 2250,2	55,3 ^{**}	14,45 ^c ± 1,16	5,25 ^d ± 0,25

* : Significatif (test de Newman-Keuls = 5%)

4.2.3. Discussion

L'étude de la variabilité culturale et morphologique des isolats de *A. rabiei* nous a permis de trouver quelques données permettant d'élargir et développer les connaissances sur ce champignon.

Cette étude montre une variabilité culturale, morphologique et biométrique. Au niveau cultural, la couleur des colonies varie entre le vert clair et le vert olive. La couleur des pycnides varie entre le brun, le noir et le brun foncé selon l'isolat, à l'exception de la couleur brun foncé pour les isolats REL2 et SB2. Les mêmes résultats ont été rapportés par Benzohra (2009), Ali et al. (2009), Zikara zine et al. (2015), Gharbi et al., (2015). Tous les isolats ont des mycéliums de type rasant. Les isolats MSC2, REL1 et REL2 ont un mycélium de type aérien. Nous avons également observé une variabilité de la couleur du cirrhe qui est marron chez les isolats. L'isolat MOS1 a une couleur saumon, et d'une couleur blanc sale pour l'isolat MSC1; des résultats similaires ont été obtenus par Khouaidja en 2000, Basandrai et al.

(2005), Benzohra (2010) sur l'aspect du mycélium et la couleur du cirrhe.

Nos résultats indiquent que le taux de croissance mycélienne de *A. rabiei* diffère d'un isolat à une autre. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Khouaidja (2000), Basandrai et al. (2005), Ali et al. (2009), Ozkilinc et al. (2010). Benzohra (2009) a constaté que le taux de croissance mycélienne varie entre 2 et 3 mm/jour. L'étude a mis en évidence également que l'abondance des pycnides est variable (peu abondant, abondant et très abondant) chez tous les isolats.

Nous signalons que l'abondance des pycnides n'est pas corrélée d'une plus grande sporulation chez un isolat, par exemple l'isolat MOS1 est peu abondant en pycnides, par contre sa sporulation est supérieure (8.75×10^5 spores/ml) comparativement aux isolats qui ont une abondance en pycnides très importante. En effet, la sporulation varie d'un isolat à l'autre ($2,25 \times 10^5$ à 12×10^5 spores /ml). Cette différence de sporulation dans d'autres isolats de *A. rabiei* (S1, S2 et S3) a été signalée par Khouaidja (2000), Basandrai et al. (2005) et Mahiout (2015). Nous constatons également que l'abondance de pycnides n'est pas synonyme de grande sporulation dans un isolat.

Il est à noter, que la taille des conidies est également variable et comparable aux données obtenues avec des isolats indiens (Basandrai et al., 2005), mais elle diffère de celle étudiée en Syrie (Atik et al., 2013).

Des travaux ont été réalisés sur des aspects culturels et morphologiques de dix isolats de *A. rabiei* collectées de différentes régions de l'ouest algérien. Ces travaux n'ont pas permis de différencier entre les isolats étudiées, mais ils ont mis en évidence des différences au niveau de leur activité pectinolytique (Gharbi et al., 2013). Les résultats obtenus sur l'étude des caractères morphologiques (macroscopiques et microscopiques) et culturels, ont mis en évidence une corrélation inverse entre croissance mycélienne et sporulation. Les isolats à forte croissance mycélienne ont une sporulation faible. Nos résultats corroborent les travaux de Mahiout (2017) qui ont révélé une corrélation inverse dans les isolats étudiés de différentes régions dans le nord ouest de l'Algérie.

IV.3. Evaluation de la variabilité pathogénique et détermination de pathotype de *A.rabiei*

4.3.1. Test de la faculté germinative des lignées de pois chiche.

L'évaluation de la faculté germinative des Treize (13) lignées de pois chiche testés est représenté dans (Fig 45 ; Annexe 13) .

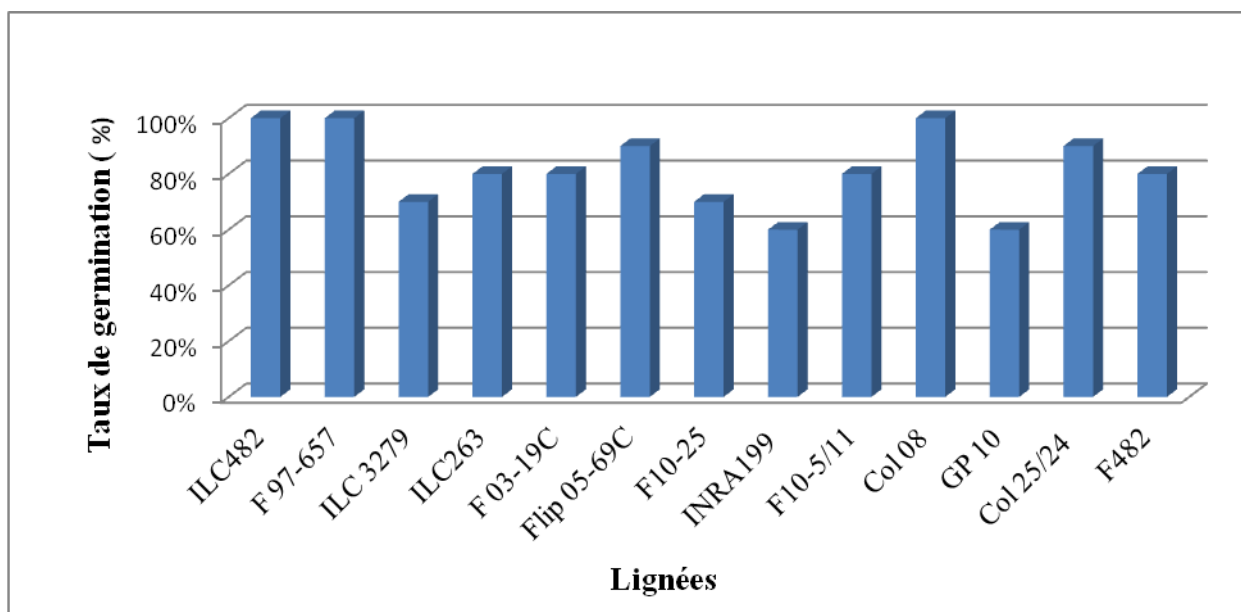


Figure 45: La faculté germinative des lignées de pois chiche après 10 jours de culture .

Le taux de germination, donne toujours une idée plus ou moins précise du comportement des variétés étudiées. La figure ci-dessus présente les variations du taux de germination, des différentes lignées de pois chiche étudiées en fonction de la température (25°C).

A travers ces résultats obtenus, nous remarquons trois lignées (ILC 482, F 97-657 et Col 08) qui ont un taux de germination le plus élevé (100 %), le taux de germination pour les lignées (ILC 3279, ILC 263, F03-19C, Flip 05-69C, F10-25, F10-5/11, Col25/24 et F482) varie entre 65% et 86 %, suivi par les lignées (INRA 199 et GP 10) ont un taux de germination de 55%, après 10 jours de semis.

4.3.2. Etude de la pathogénicité de *Ascochyta rabiei*

4.3.2.1. Inoculation de la lignée sensible de pois chiche ILC 263

L'inoculation de la lignée ILC 263 avec les dix isolats de *A.rabiei*, a permis de reproduire les symptômes typiques de l'antrachnose du pois chiche. Le ré-isolement du pathogène à partir des plantes infectées artificiellement a été réalisé avec succès.

Ces résultats confirment l'hypothèse du postula de Koch. La présence de *A. rabiei* a été confirmée. Différents degrés de virulence de l'antrachnose causés par les différents isolats de *A. rabiei* ont été enregistrés après inoculation de la variété sensible de pois chiche ILC263 (Fig.46. Annexe 14) et des symptômes typiques de la maladie ont été observés (Fig.47).

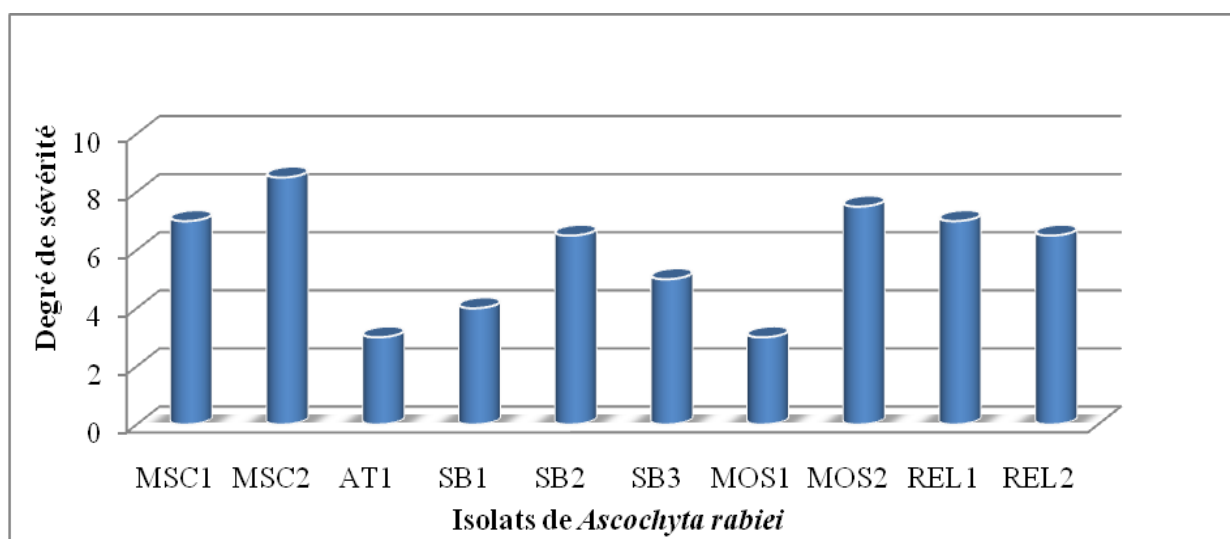


Figure 46. Moyenne de degrés de sévérité de l'antrachnose sur la ligne sensible ILC 263 de pois chiche.

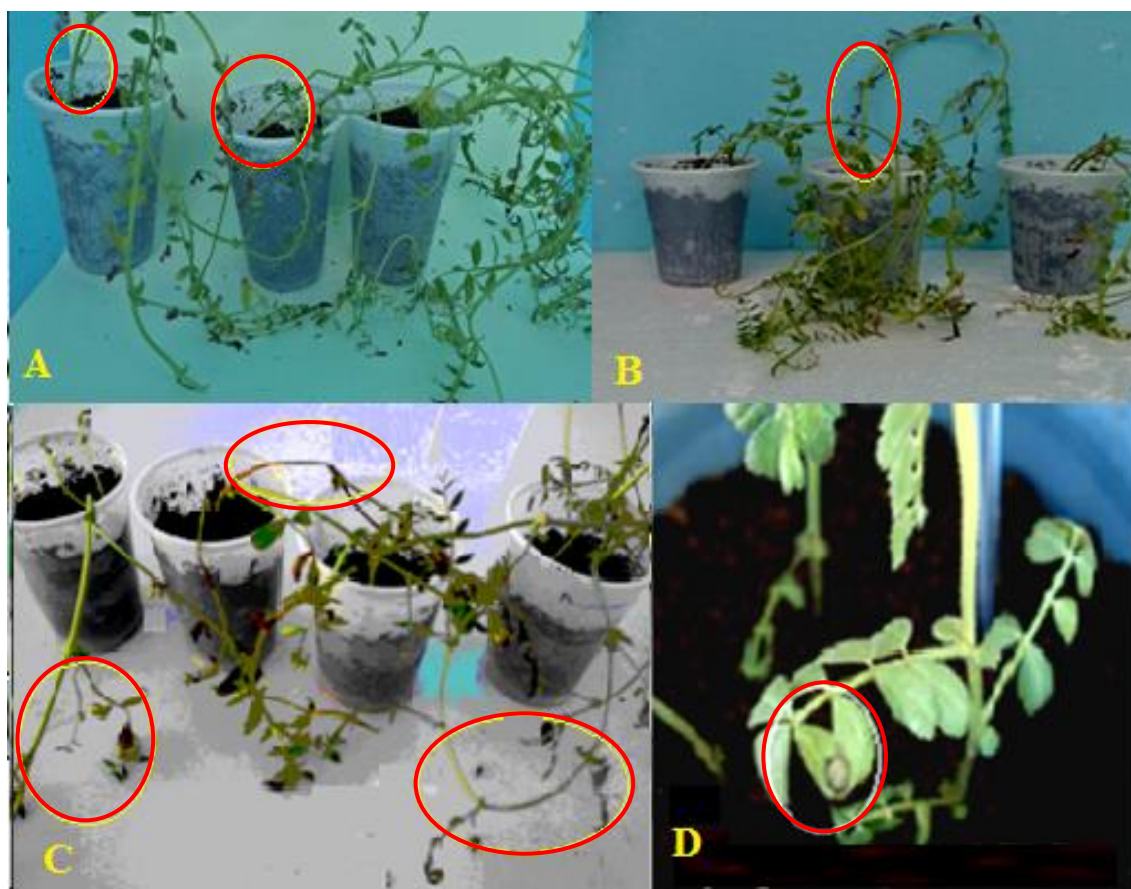


Figure 47 : Symptômes de *A. rabiei* sur lignée ILC 263.

A : non agressif (MOS1) ; **B :** moyennement agressif (REL1) ; **C :** Très agressifs (MSC2) ;
D : Symptômes sur folioles

Les résultats présentés dans la figure 47 nous a permis de classer nos isolats selon les niveaux de sévérité de la maladie de l'anthracnose sur lignée ILC263 en trois niveaux:

- **Niveau 1:** Deux isolats très agressifs (MSC2 et MOS2) avec des niveaux de sévérité qui varient entre 8 et 9.
- **Niveau 2:** Cinq isolats sont moyennement agressifs (MSC1, SB2, SB3, REL1 et REL2) avec des niveaux de sévérité qui varient entre 5 et 7.
- **Niveau 3:** Trois sont non agressifs (AT1, SB1 et MOS1) avec des niveaux de sévérité qui varie entre 1 et 4.

4.3.3. Etude de la variabilité pathogénique des isolats de *A. rabiei*

Après une période d'incubation de 5 à 6 jours. La période de latence est comprise entre 8 et 9 jours. Cette différence nous indique que le temps nécessaire à l'apparition des premières

pycnides varie d'un isolat à un autre (Tab.18).

Tableau 18: Les périodes d'incubation et de latence (en jours) des isolats de *A. rabiei*.

Isolats	Périodes d'incubation (en jour)	Périodes de latence (en jour)
MSC1	5 ± 0.81	8 ± 0.81
MSC2	5 ± 0.81	9 ± 0.81
AT1	6 ± 0.81	9 ± 0.81
SB1	5 ± 0.81	9 ± 0.81
SB2	5 ± 0.81	8 ± 0.81
SB2	6 ± 0.81	9 ± 0.81
MOS1	5 ± 0.81	9 ± 1.15
MOS2	6 ± 0.81	9 ± 0.81
REL1	5 ± 0.81	8 ± 1.15
REL2	5 ± 0.81	8 ± 0.81
Moyenne	5.3	8.6

L'évaluation de l'agressivité des isolats de *A. rabiei* a permis de mettre en évidence l'existence de trois isolats très agressifs (REL1, SB2 et MSC2) avec des niveaux d'agressivité allant de 6 et 8 respectivement.

Cinq isolats sont moyennement agressifs avec des niveaux d'agressivité allant de 4 à 6 (MSC1, SB1, SB3, MOS2 et REL2) et deux isolats non agressifs, avec des niveaux d'agressivité allant de 1 à 4 (AT1 et MOS1) (Fig.48 et 49. Annexe 15).

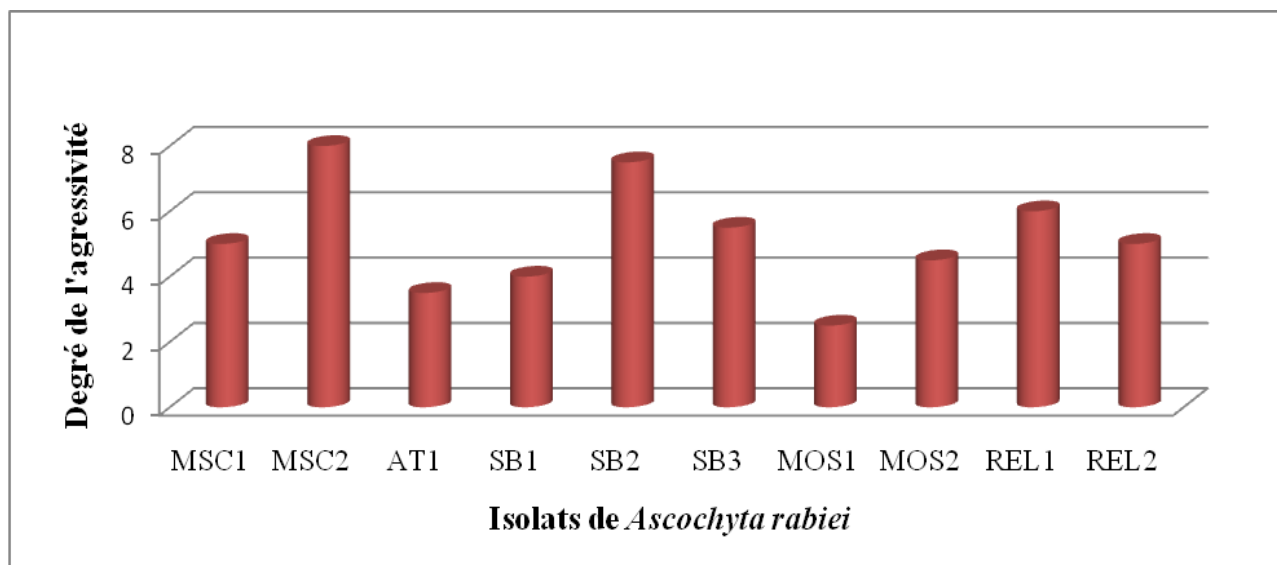


Figure 48. Moyenne d'agressivité des isolats de *A. rabiei*

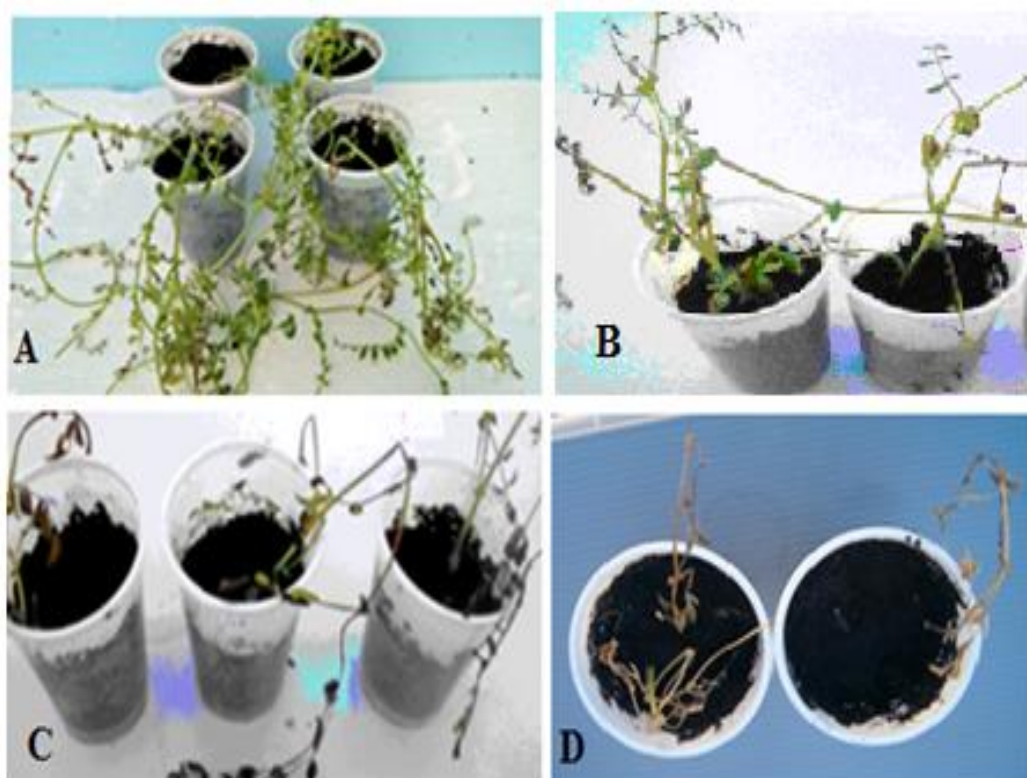


Figure 49. Symptômes d'antracnose sur plantes de pois chiche.

A : sur feuilles (ILC482) par isolat MOS2 ; **B :** sur folioles et tige (F03-19C) par isolat SB2 ; **C :** sur la plante (ILC 3279) par isolat MSC2 ; **D :** mort complète de la plante (F1025) par isolat REL2.

Selon l'analyse des résultats il s'avère que l'isolat MSC2 est plus agressif (5,95a) comparativement aux autres isolats, vis-à-vis des variétés inoculées, suivi par l'isolat REL1

(5,05b), isolats AT1 et MOS1 (2,85e et 2,55f) respectivement non agressifs.

Les isolats MSC1, SB1, SB3, MOS2 et REL2 sont moyennement agressifs (Groupes b, c et d). Les isolats AT1 et MOS1 sont non agressifs (Groupes e et f), car les lignées inoculées sont résistantes aux isolats AT1 et MOS1.

Ces résultats nous permettent de classer nos isolats en trois (3) niveaux d'agressivité: isolats très agressifs, isolats moyennement agressifs et isolats non agressifs.

A travers ces résultats, nous constatons que l'agressivité de *A. rabiei* est variable, avec des différences hautement significatives entre les isolats étudiées (Tab.19).

Tableau 19. Groupes homogènes de degré de l'agressivité des isolats de *A. rabiei* sur 12 lignées de pois chiche testées (test de Newman-Keuls = 5%).

Isolats	MSC1	MSC2	AT1	SB1	SB2	SB3	MOS1	MOS2	REL1	REL2	E.T	Test F
d'agressivité Moyenne	4.12c.d	5.95 a	2.85e	3,35de	4,98b	4.55c	2.55f	4,25c.d	5,05 b	3,25 d,e	0.8	30.5**

** Effet hautement significatif; E.T: Ecart type.

De même, compte tenu de la réaction des lignées de pois chiches aux isolats de *A. rabiei*, nous avons remarqué des différences significatives entre les lignées testées.

Cette réaction varie d'une ligne à une autre (Tab.20 et 21. Fig50). Lignée ILC3279 considérée comme résistante en Algérie et dans d'autres pays (Zikara-Zine et Bouznad 2007). La lignée ILC482, connue pour être tolérante, est sensible à d'autres isolats.

Généralement, la réaction des différentes lignées aux isolats de *A. rabiei* varie entre sensibilité, tolérance et résistance.

L'analyse de l'interaction Isolat (F1) x Variété (F2), montre un effet significatif (Tab.20 et 21).

Tableau 20: Sévérité de l'antracnose sur les lignées de pois chiche testées (10 jours après l'inoculation).

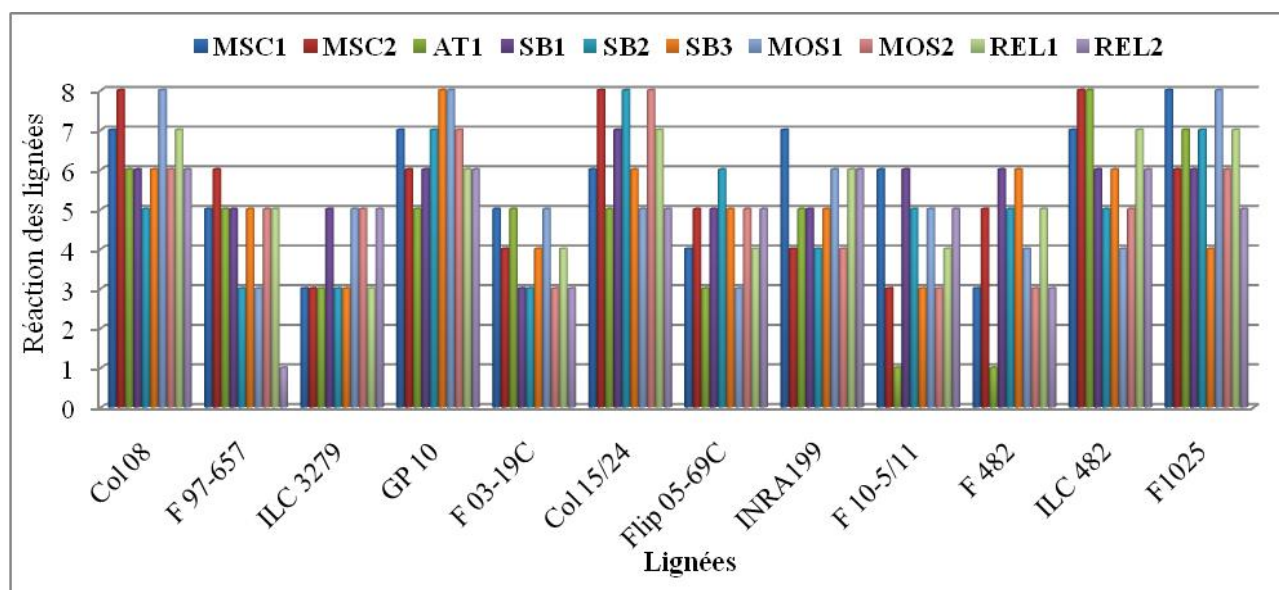
Lignées	MSC1	MSC2	AT1	SB1	SB2	SB3	MOS1	MOS2	REL1	REL2
Col 08	7.0	8.0	6.0	6.0	5.0	6.0	8.0	6.0	7.0	6.0
F97-657	5.0	6.0	5.0	5.0	3.0	5.0	3.0	5.0	5.0	1.0
ILC 3279	3.5	3.5	3.0	5.0	3.0	3.0	5.0	5.0	3.0	5.0
GP 10	7.0	6.0	5.0	6.0	7.0	8.0	8.0	7.0	6.0	6.0
F03-19C	5.0	4.0	5.0	3.0	3.0	4.0	5.0	3.0	4.0	3.0
Col 15/24	6.0	8.0	5.0	7.0	8.0	6.0	5.0	8.0	7.0	5.0
Flip 05-69C	4.0	5.0	3.0	5.0	6.0	5.0	3.0	5.0	4.0	5.0
INRA199	7.5	4.5	5.0	5.0	4.0	5.0	6.5	4.5	6.0	6.0
F10-5/11	6.5	3.5	1.5	6.0	5.0	3.0	5.0	3.0	4.0	5.0
F482	3.0	5.0	1.0	6.0	5.0	6.0	4.0	3.0	5.0	3.0
ILC482	7.0	8.0	8.5	6.0	5.0	6.0	4.0	5.0	7.0	6.0
F1025	8.0	6.5	7.0	6.0	7.0	4.5	8.0	6.5	7.0	5.0

ppds F1et F2 = 1,254, ppds F1 x F2 = 4,102 et 6.033 C.V= 18.20%.

Tableau 21 : Groupes homogènes de la réaction des lignées de pois chiches après l'inoculation par 10 isolats de *A. rabiei* (test de Newman-Keuls = 5%).

Lignées	ILC 482	ILC 3279	INRA 199	Col 25/24	Flip 05-69C	Col 08	GP 10	F 0319C	F 97-657	F 1025	F 482	F 10.5/11	E.T Test F
Réaction	5.75a	4.34bcd	4.42bcd	5.14abc	4.55cd	4.95c	4.62cd	4.09 d	4.45bcd	5.45ab	4.25cd	4.15d	0.8 5.36*

* Significatif à 0.05 ; E.T : Ecart type

**Figure 50:** Réaction des lignées de pois chiche à *A. rabiei*.

Le tableau 22 regroupe les réactions de lignées testées de pois chiche vis-à-vis des isolats de *A. rabiei*.

Tableau 22: Réaction des lignées de pois chiche testés vis-à-vis des isolats de *A. rabiei*.

Lignées	ILC 482	ILC 3279	INRA 199	Col 25/24	Flip 05-69 C	Col 08	GP 10	F 03-19 C	F 97-657	F 1025	F 482	F 10-5/11
MSC1	S	R	S	S	T	S	S	T	T	S	R	T
MSC2	S	R	T	S	T	S	S	T	T	S	T	R
AT1	S	R	T	T	R	S	T	T	T	S	R	R
SB1	S	T	T	S	T	S	S	R	T	S	T	T
SB2	T	R	T	S	T	T	S	R	R	S	T	T
SB3	S	R	T	T	T	T	S	T	T	T	T	R
MOS1	T	T	T	T	R	S	S	T	R	S	T	T
MOS2	T	T	T	S	T	S	S	R	T	S	R	R
REL1	S	R	S	S	T	S	S	T	T	S	T	T
REL2	S	T	S	T	T	T	T	R	R	T	R	T

Résistant (R) = 1-3,9; Tolérant (T) = 4-5,9; Sensible (S) = 6-7,9; Très sensible (TS) = 8-9

L'analyse de la variance montre que les effets du pathogène et de l'isolat ainsi que leur interaction sont significatifs pour ces paramètres (Tab.23.).

Tableau 23: Analyse de variance du pouvoir pathogène des isolats étudiés de *A.rabiei* (10 jours après l'inoculation) (Le test de Newman –Keuls à 1%).

Source de variation	SCE	^a DDL	^b CM	TEST F	PROBA	E.T	C.V.
Isolat	645,124	12	75.01	30,50*	0		
Génotype	756,411	12	112.46	5,36*	0		
Isolat x Génotype	977,122	140	5.33	18.40*	0		
Erreur	257,145	512	1.25			0.8	18.20%

SCE : Somme des carrés des écarts ; ^aDDL : Degrés de liberté ; ^bCM : Carré moyen ; E.T. : Ecart type ; C.V : Coefficient de variation ; * Significatif à 0.01.

Concernant la corrélation, les résultats obtenus sur les critères microscopiques (sporulation) ne sont pas corrélés avec le pouvoir pathogène (l'agressivité), ces résultats nous a permis d'observer une corrélation inverse entre ces deux critères et chez les isolats testées, par exemple nous avons observé que les isolats AT1 et MOS2 possèdent une sporulation élevée (7.25×10^5 spores /ml et 8.75×10^5 spores/ml) respectivement, cependant ces isolats sont moins agressifs (3.5 et 2.5) respectivement que d'autres isolats dont la sporulation est inférieur (Fig.51).

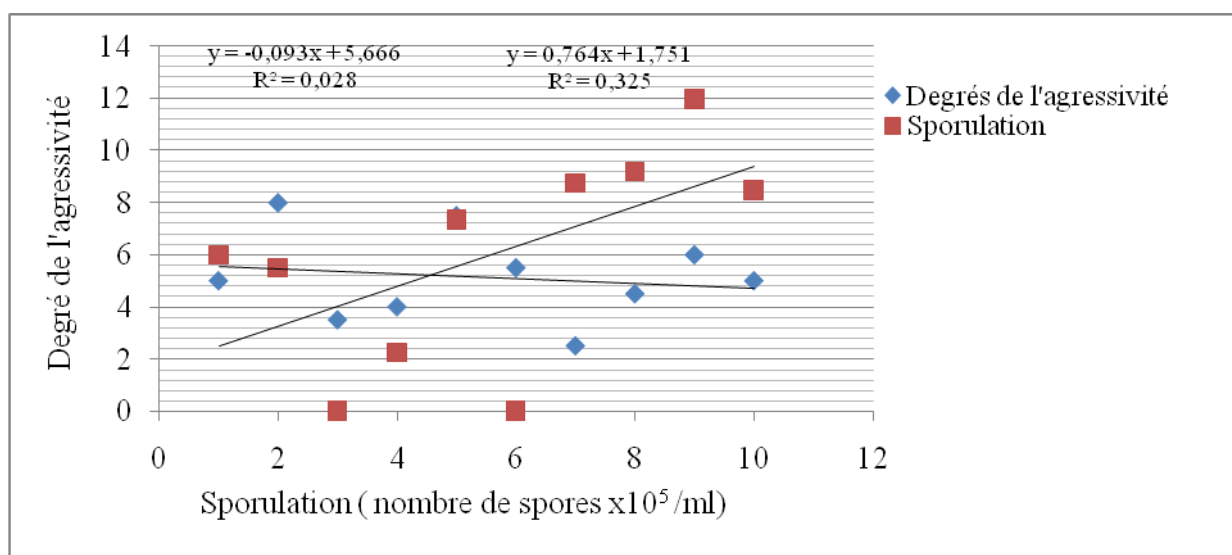


Figure 51 : Corrélation entre l'agressivité et la sporulation des isolats de *A.rabiei* testées.

Les variétés ILC3279, F482 et F10-5/11 sont généralement résistantes à tolérantes pour tous les isolats testés. Les variétés Flip05-69C, F03-19C et F97-657 sont tolérantes aux isolats mais résistantes aux autres. Les variétés ILC482, Col25/24, Col08, GP10 et F1025 sont sensibles à sept (07) isolats et sont tolérantes aux autres. La variété INRA199 est tolérante aux isolats (MSC2, AT1, SB1, SB2, SB3 MOS1 et MOS2), mais sensible aux isolats (MSC1, REL1 et REL2). À travers nos résultats obtenus, nous pouvons classer les différentes lignées testées dans les catégories suivantes:

Catégorie 1: Variétés résistantes à tolérantes : ILC3279, F 482, F10-5/11 et F03-19 C

Catégorie 2: Variétés tolérantes à tous les isolats: Flip 05-69 C, F97-657 et INRA199

Catégorie 3: Variétés moyennement tolérantes aux isolats: Col 25/24, Col08 et GP10

Catégorie 4: Variétés sensibles à moyennement tolérantes: ILC482 et F1025.

4.3.4. Discussion

L'étude de la variabilité pathogénique des isolats de *A. rabiei*, nous a permis de trouver des données permettant d'élargir et de développer les connaissances sur ce champignon.

L'étude de la pathogénicité des isolats vis à vis d'une gamme de lignées différentes, nous a permis de constater une différence significative dans l'agressivité de nos isolats, ainsi qu'une différence dans la réaction des différentes lignées testées, montrant l'existence d'une variabilité pathogénique dans tous les isolats de *A. rabiei*.

Les résultats obtenus sur la lignée ILC263 confirment leur sensibilité à un grand nombre

d'isolats. Les mêmes résultats ont été rapportés par certains auteurs (Iqbal et *al.* 2004; Benzohra, 2010).

Lors de notre investigation, nous avons observé que la période d'incubation varie entre 5 et 6 jours selon les isolats, tandis que Benzohra en 2011 a rapporté que la période de latence dure de 8 à 9 jours. Dans une étude similaire de la virulence de six isolats algériens testés sur six lignées différentielles, Zikara-Zine et Bouznad (2007) ont constaté que la période d'incubation varie entre 8 et 9 jours, alors que la latence varie entre 10 et 13 jours.

Des différences significatives de degré de sévérité ont été trouvées pour l'isolat, concernant l'évaluation du degré d'agressivité de nos isolats, les résultats obtenus nous ont permis de constater que les isolats (MSC2, SB2 et REL1) sont très agressifs. Les isolats (MSC1, SB1, SB3, MOS2 et REL2) sont modérément agressifs et les isolats (AT1 et MOS1) sont non agressifs.

Ces résultats nous permettent de classer ces isolats en trois (3) niveaux d'agressivité: isolats très agressifs, isolats modérément agressifs et isolats non agressifs. Cette variabilité au niveau de l'agressivité a également été indiquée par Jamil et *al.* (2000). Chen et *al.* (2004). Chongo et *al.* (2004). Zikara-Zine et Bouznad (2007). Mahiout (2015). Benzohra (2011). Jayakumar et *al.* (2005) Ben Mbarek, (2011), et en Inde par Basandri et *al.* (2005). La même étude sur différentes lignées de pois chiches a été réalisée en Turquie par Ozkilinc et *al.* (2011).

Compte tenu de la réaction des lignées aux isolats de *A. rabiei*, nous avons également remarqué des différences significatives entre les lignées testées. Lignée ILC3279 considérée comme résistante en Algérie et dans d'autres pays (Labdi 1995, Zikara-Zine et Bouznad 2007, Mahiout, 2017, Benzohra, 2010). La lignée ILC482, connue pour être tolérante, est sensible à d'autres isolats, ces résultats sont similaires avec ceux obtenus par Iqbal et *al.* (2004). Pande et *al.* (2005) et sensible à la plupart des isolats comme décrit pour *A. rabiei* en Syrie par Atik et *al.* (2013). Généralement, la réaction des différentes lignées aux isolats de *A. rabiei* varie entre sensibilité, tolérance et résistance.

4.4. Détermination de pathotype

Les dix isolats de *A. rabiei* utilisées dans cette étude sont classés en trois pathotypes (Pathotype I, II et III), avec trois lignées de pois chiche différentiels et l'évaluation de la

réaction de ces trois génotypes testés à l'antracnose (*A. rabiei*) (ILC 3279, ILC 482 et ILC 1929). Nous avons fait un test d'identification de pathotypes selon les régions prospectées dans l'ouest algérien (Tab.24).

Tableau 24: Classement des dix (10) isolats de *A.rabiei* en pathotypes par l'utilisation de trois lignées de pois chiche testés.

Lignées			Pathotypes	Nombre d'isolats
ILC 482	ILC 1929	ILC 3279		
R	S	R	I (Faiblement agressif)	2
R	S	R	I (Faiblement agressif)	1
S	S	R	II (Moyennement agressif)	1
S	S	S	III (Hautement agressif)	3
S	S	S	III (Hautement agressif)	3

R : Résistante ; S :Sensible

Les résultats obtenus sur l'identification des pathotypes, nous permis de classer nos isolats en 3 pathotypes. Les trois pathotypes obtenus dans les régions prospectées, bien que la distribution de chaque pathotype soit différente.

Trois isolats (23%) appartiennent au pathotypes I (faiblement agressif), un isolat (12%) au pathotype II (moyennement agressif), et six isolats (65%) appartiennent au pathotype III (hautement agressif) qui est le plus dominant dans toutes les régions de l'ouest algérien prospectées (Mascara, Sidi Bel Abbes, Mostaganem et Relizane) à l'exception de la région de Ain Temouchent, suivi par le pathotype I présent dans trois régions (Mascara, Sidi Bel Abbes et Mostaganem), et en fin le pathotype II présent dans une seule région (AinTemouchent) (Fig.52).

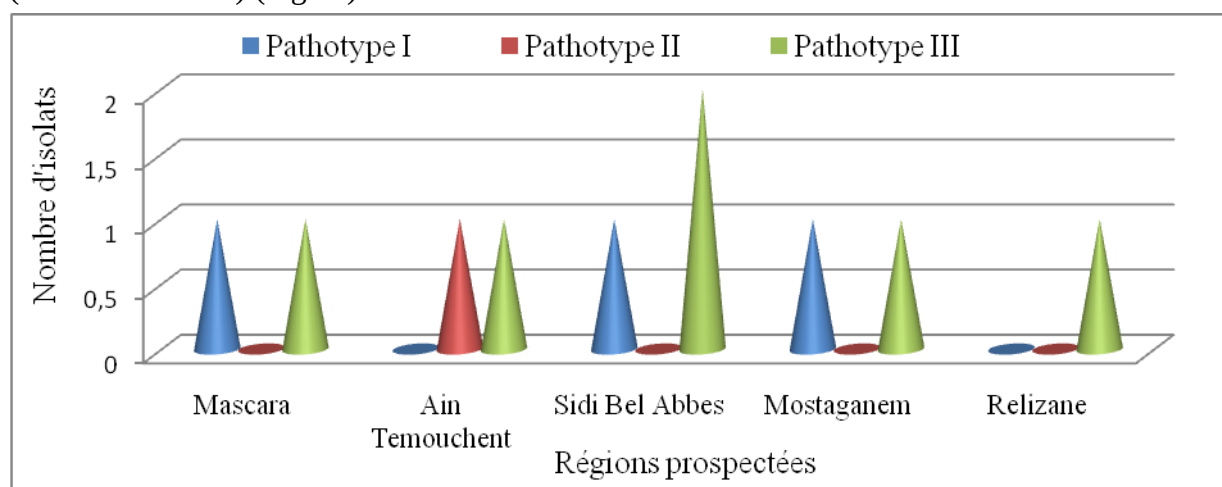


Figure 52 : Distribution géographique des pathotypes de *A.rabiei* dans les régions prospectées de l'ouest algérien.

La figure ci-dessous (Fig.53) présente la moyenne de distribution des pathotypes en %.

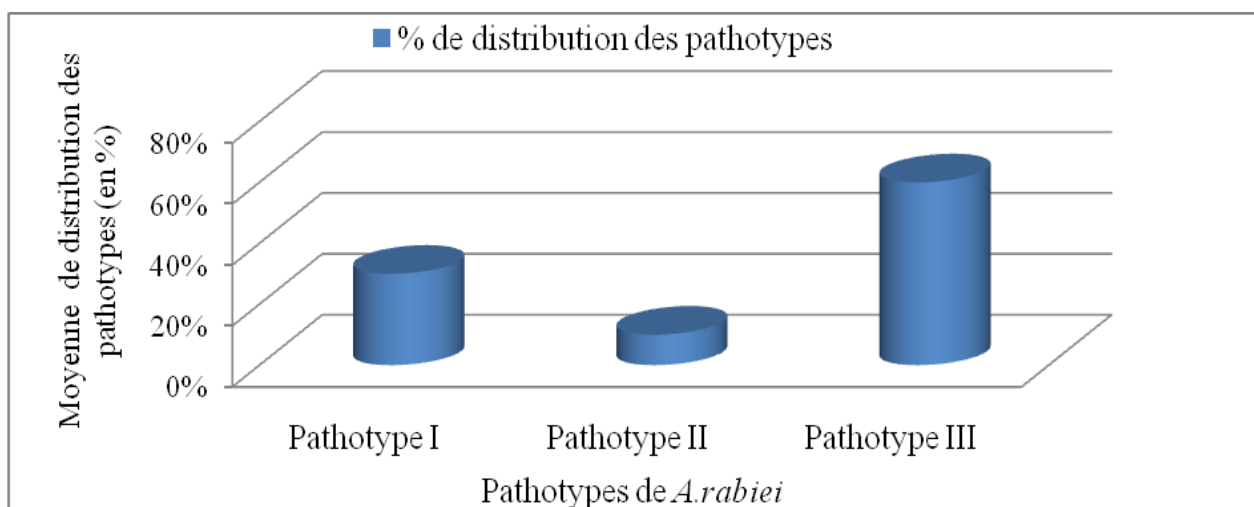


Figure 53 : Moyenne de distribution des pathotypes (en %).

Les isolats MSC2 et REL1 (pathotype III) sont les plus agressifs sur lignée ILC1929 (Fig.54)

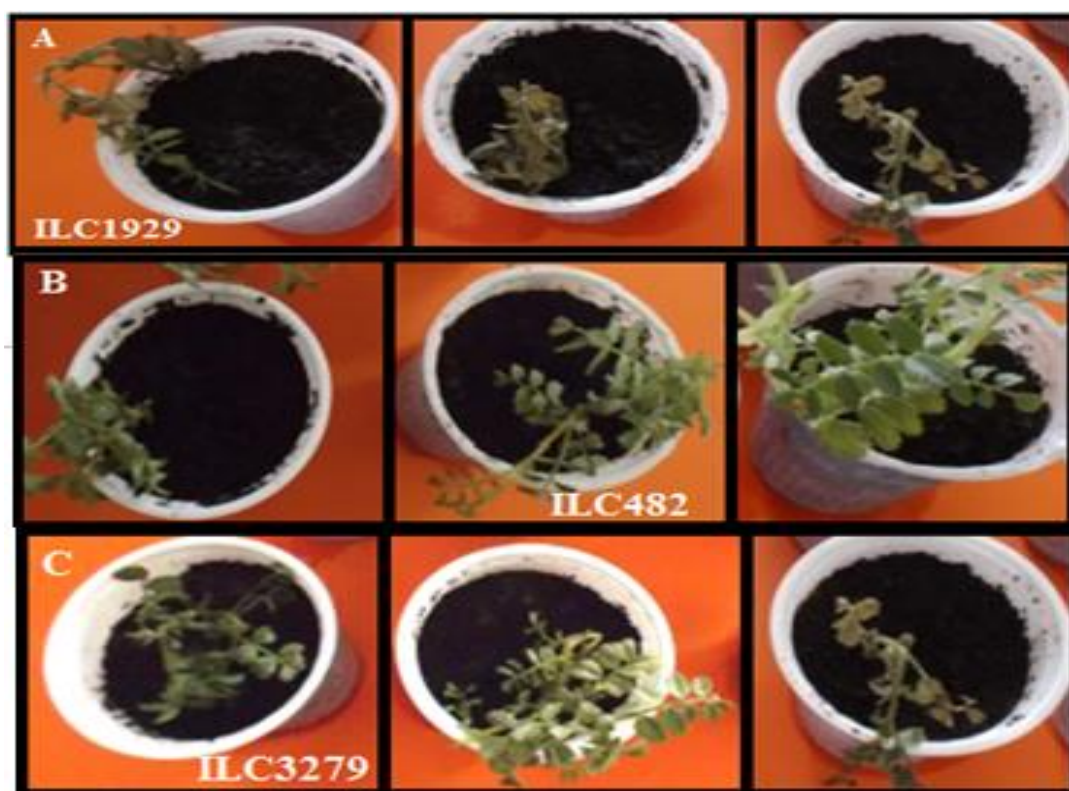


Figure 54 : Symptômes de l'anthracnose.

A : sur les plantes de ILC 1929 inoculée par l'isolat MSC2 ; **B :** plantes de ILC 482 inoculée par l'isolat REL1 ; **C :** plantes de ILC 3279 inoculée par l'isolat MOS1.

Les résultats obtenus sur l'analyse de variance (au seuil de 1%) sont significatifs (Tab.25). Le test de Newman-Keuls a permis le classement des lignées et les isolats en différents groupes (Tab.26. Annexe 16).

Tableau 25: Analyse de variance du test de pathogénicité des isolats de *A. rabiei* (15 jours après l'inoculation) par les lignées différentielles de pois chiche testées.

Source de variation	DDL	CM	TEST F	PROBA	E.T	C.V.
Isolat	14	35.05	55.34*	0		
Génotype	3	212.14	315,35*	0		
Isolat x Génotype	42	7.12	15.40*	0		
Erreur	122	1.02			1.08	25.35%

* significatif à 0,01.

Tableau 26: Différents pathotypes de *A.rabiei* (après l'inoculation de lignées de pois chiche différentielles).

Isolats	Lignées			Moyenne	Pathotypes
	ILC482	ILC1929	ILC3279		
MSC1	2±0,00	8±0,00	2,6±0,85	4.2 ^{de}	I
MSC2	6±0,00	8±0,00	6.5±1,05	6.8 ^{bc}	III
AT1	6±0,00	7,6±0,85	4±0,00	5.8 ^{cd}	II
SB1	6,5±1.05	8±0,00	6±0,00	6.8 ^{bc}	III
SB2	4±0,00	7±0,00	2.7±0,85	4.5 ^{de}	I
SB3	6±0.00	8±0,00	6±0,00	6.6 ^{bc}	III
MOS1	1.7±0,85	6,7±0,85	2±0,00	3.4 ^e	I
MOS2	7±0,00	8,6±0,85	6±0,00	7.2 ^a	III
REL1	6±0,00	8±0,00	6.7±0,85	6.9 ^b	III
REL2	6±0,00	8.7±0,85	6±0,00	6.9 ^b	III
Moyenne	5.12 ^b	7.86 ^a	4.85 ^c		

4.4.1. Discussion

Le but visé dans cette partie de notre étude consiste à identifier et décrire les niveaux d'agressivité des isolats avec de génotypes différentiels de pois chiche. Plusieurs travaux ont été réalisés sur l'identification de trois pathotypes (Jamil et *al.*, 2000; Chen et *al.*, 2004 ; Mahiout, 2017 ; Benzohra et *al.*, 2015 ; Vail et Banniza, 2008).

Les résultats obtenus montrent que l'agressivité des isolats est généralement modérée. Le pathotype III est le plus dominant dans toutes les régions de l'ouest algérien prospectées (Mascara, Sidi Bel Abbes, Mostaganem et Relizane) à l'exception de la région d'Ain

Temouchent, suivi par le pathotype I présent dans trois régions (Mascara, Sidi Bel Abbès et Mostaganem), pathotype II se trouve seulement à Ain Temouchent. En revanche, Udupa et *al.* (1998) n'ont constaté que 5 isolats du pathotype II en Syrie (9,5%). Udupa et Weigand (1997) ont utilisé trois lignées différentielles (ILC 1929, ILC 482 et ILC 3279) pour identifier trois pathotypes (Pathotypes I, II et III), selon leur degré d'agressivité. Ils suggèrent que les 3 lignées différentielles de pois chiche (ILC1929 comme sensible aux 3 pathotype « I, II et III », ILC 482 sensible aux pathotypes II et III, et ILC 3279 sensible au pathotype III). Il suppose que ceci est suffisant pour classer les isolats de *A. rabiei* en trois pathotypes en se basant sur le niveau croissant de l'agressivité, ce qui corrobore nos résultats obtenus.

Le pathotype I, étant moins agressif que les pathotypes II et III, certaines lignées sont donc résistantes au pathotype I. En effet, le pathotype III est capable de s'entrecroiser avec d'autres pathotypes et donner lieu à une descendance hautement agressive (Sharma et Ghosh, 2016) capable de s'attaquer à l'ensemble des cultures avoisinantes.

Tous les pathotypes utilisés par Udupa et Weigand (1997) sont actuellement présents dans l'ouest algérien lors de la prospection des régions étudiées. En outre, la sensibilité des génotypes locaux est établie; des cultivars connus jusque-là comme résistants lors de leur introduction en Algérie, Nos résultats montrent que le pathotype le plus dominant dans l'ouest algérien est la pathotype III qui est également dominant avec le pathotype III en Turquie (Türkkan et Dolar, 2009).

La tolérance de lignée différentielle de pois chiche ILC 482 décrite par (Iqbal et *al.*, 2004), n'est pas confirmée vis-à-vis de 2 pathotypes (II et III) de *A. rabiei* dans nos résultats. De même, cette sensibilité de cette lignée a été signalée par Singh et Reddy (1990), ce qui confirme nos résultats. Trois pathotypes de *A. rabiei* sont obtenus par l'utilisation de 130 isolats au Pakistan (Jamil et *al.*, 2000), 64 isolats en Turquie (Türkkan et Dolar 2009). Nous avons montré que dix (10) isolats algériens de *A. rabiei* peuvent être classés en trois pathotypes (I, II et III).

Par ailleurs, plusieurs travaux antérieurs ont rapporté la présence d'interaction isolat-génotype dans le système pois chiche - *A. rabiei* (Chettou et *al.*, 2005 ; Mahiout, 2017; Bouznad, 1991; Reddy et Kabbabeh, 1985; Aujla, 1964). Les isolats de *A. rabiei* étudiées de l'ouest algérien ont montré une variabilité pathogénique large et trois pathotypes ont été observés.

IV.4. Etude de quelques facteurs abiotiques sur la croissance de *A.rabiei*

4.4.1. Influence des facteurs nutritionnels sur la croissance mycélienne de *A rabiei*

4.4.1.1. Effets des milieux de culture sur la croissance mycélienne

La croissance des différents isolats de *A.rabiei* étudiées varie en fonction du milieu de culture. Le suivi de la croissance mycélienne de nos isolats (MSC1, AT1, SB1, MOS1 et REL1) sur quatre milieux de culture à savoir le milieu Malt, le milieu CSMDA, le milieu PDA, et milieu Sabouraud, est rapporté dans le tableau 27 et représenté graphiquement dans la figure (Fig. 55A. et B).

Les résultats obtenus ont mis en évidence un différent comportement de nos isolats en matière de croissance. Effectivement, nous avons enregistré une croissance importante sur le milieu CSMDA pour l'ensemble des isolats et plus au moins similaire sur les milieux Malt et PDA. En revanche une faible croissance a été observée dans le milieu Sabouraud.

Sur le milieu Malt la croissance de nos isolats varie entre (5.25 et 8.25 mm), alors qu'elle est variée (9.33 et 12.50 mm) sur le milieu CSMDA, sur le milieu PDA la croissance varie entre (6.25 et 10.50 mm). La croissance la plus faible des isolats a été enregistrée sur le milieu Sabouraud et elle varie entre (3.5 et 6.5 mm) (Annexe 17).

Selon les résultats, il s'avère que le milieu CSMDA est le milieu le plus favorable pour la croissance de *A.rabiei*. Un bon développement du champignon a été observé sur ce milieu (CSMDA) comparativement aux autres milieux testés.

Tableau 27: Croissance mycélienne des isolats de *A.rabiei* sur les différents milieux de culture testés (culture de 14 jours).

Isolats	Croissance mycélienne (Moyenne en mm $\pm$ Ecart-type).			
	Milieux de culture testés			
	Malt	CSMDA	PDA	Sabouraud
MSC1	6,33 $\pm$ 2,223	12.50 $\pm$ 2,122	8.33 $\pm$ 0,223	4.50 $\pm$ 2,125
AT1	5,33 $\pm$ 1,244	10,33 $\pm$ 0,251	6,25 $\pm$ 1,252	3,50 $\pm$ 1,051
SB1	8,25 $\pm$ 1,082	12,25 $\pm$ 1,232	10,50 $\pm$ 1,232	4,25 $\pm$ 1,031
MOS1	6,25 $\pm$ 2,785	9.33 $\pm$ 1,223	7.33 $\pm$ 1,024	5.33 $\pm$ 1,021
REL1	5,25 $\pm$ 3,214	11.33 $\pm$ 3,215	6.25 $\pm$ 1,015	6.50 $\pm$ 1,022

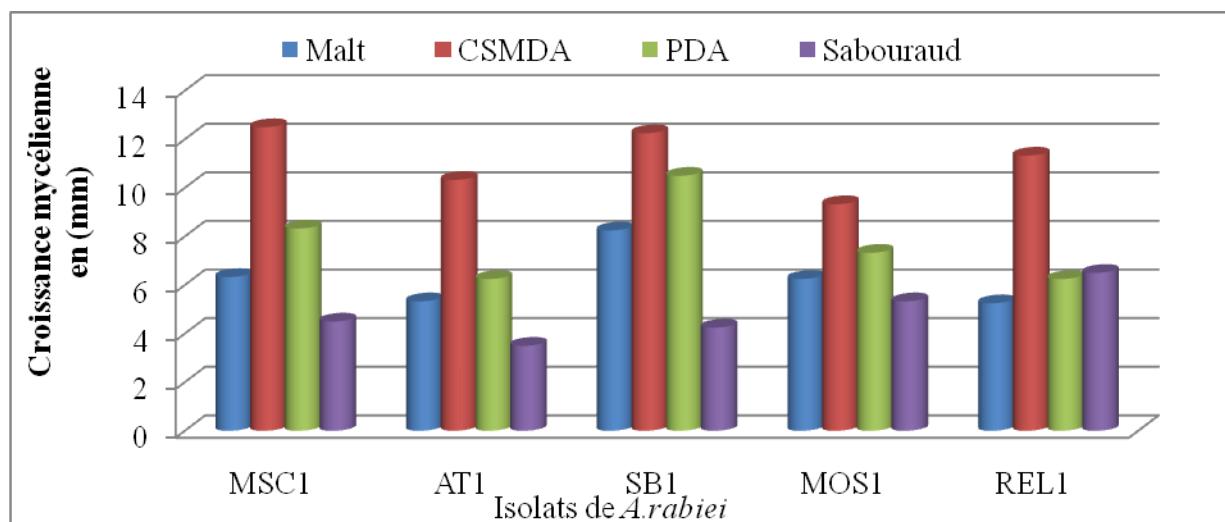


Figure 55A: Croissance mycélienne des isolats de *A. rabiei* après 14 jours de culture sur les différents milieux de culture testés.

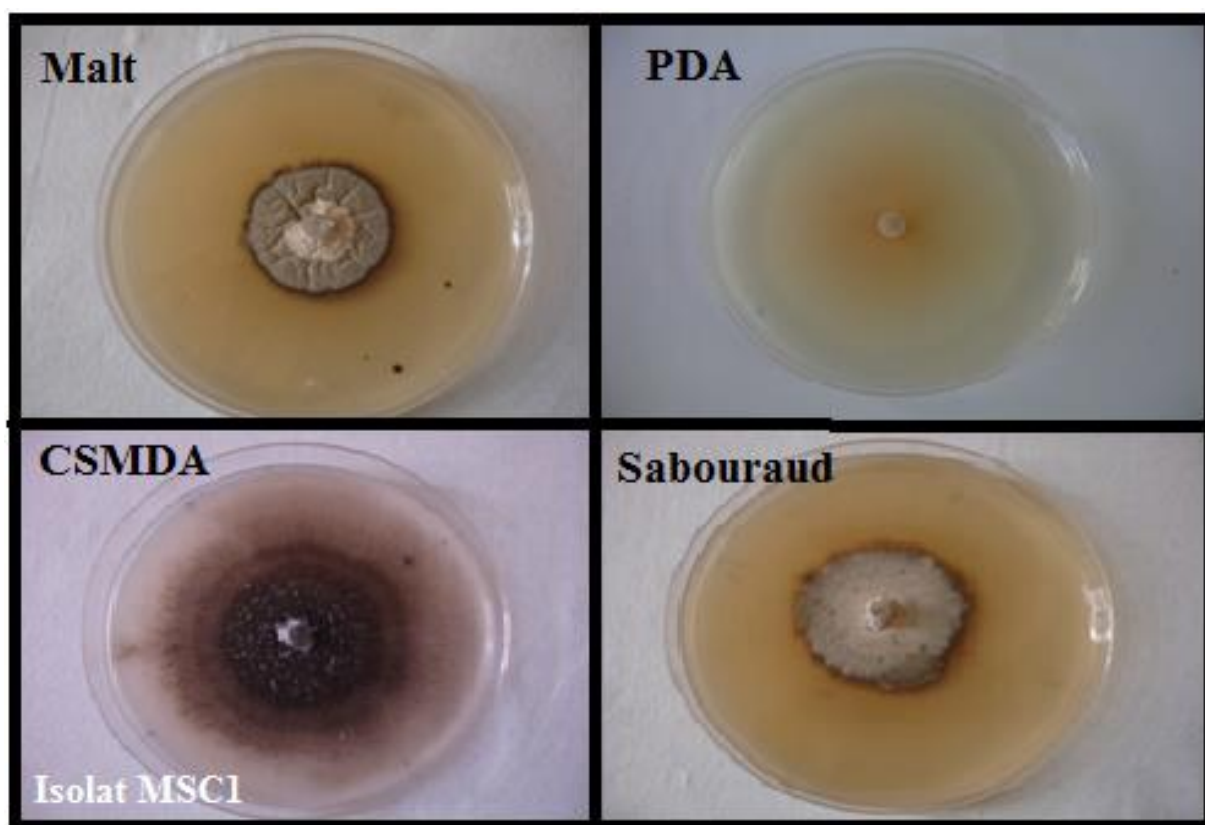


Figure 55B : L'effet de différents milieux de culture testés sur la croissance mycélienn de *A. rabiei* après 14 jours d'incubation

A travers les résultats obtenus, nous avons constaté que l'effet du milieu de culture est variable, avec des différences hautement significatives entre nos isolats.

L'étude statistique de la croissance mycélienne obtenue sur les différents milieux

étudiés ainsi que celles relevées sur ces milieux ayant permis l'obtention des meilleurs résultats (analyse de la variance, test Newman-Keuls-Seuil =5%) nous montre que les différences enregistrées sont significatives et les degrés de signification sont rapportées sur le tableau suivant (Tab.28).

Tableau 28: Analyse de la variance de la croissance mycélienne (culture de 14 jours) obtenus sur les différents milieux de culture testés (Test de Newman- Keuls-Seuil =5%).

Isolats	Croissance mycélienne (Moyenne en mm $\pm$ Ecart-type)							
	Malt		CSMDA		PDA		Sabouraud	
	Moyenne	Test F	Moyenne	Test F	Moyenne	Test F	Moyenne	Test F
MSC1	6,33 ^a $\pm$ 2,223	38 ^{**}	12,50 ^b $\pm$ 2,122	58 ^{**}	8,33 ^b $\pm$ 0,223	32,14 [*]	4,50 $\pm$ 2,125	7 ^{NS}
AT1	5,33 ^a $\pm$ 1,244	22,5 [*]	10,33 ^b $\pm$ 0,251	28,5 [*]	6,25 ^b $\pm$ 1,252	22,45 [*]	3,50 $\pm$ 1,051	5,5 ^{NS}
SB1	8,25 ^a $\pm$ 1,082	47,5 ^{**}	12,25 ^b $\pm$ 1,232	52,5 ^{**}	10,50 ^b $\pm$ 1,232	40,5 ^{**}	4,25 $\pm$ 1,031	4,45 ^{NS}
MOS1	6,25 ^a $\pm$ 2,785	25 [*]	9,33 ^b $\pm$ 1,223	22 [*]	7,33 ^b $\pm$ 1,024	35,5 [*]	5,33 ^d $\pm$ 1,021	12,5 [*]
REL1	5,25 ^a $\pm$ 3,214	14 [*]	11,33 ^b $\pm$ 3,215	44,5 ^{**}	6,25 ^b $\pm$ 1,015	18,45 [*]	6,50 ^d $\pm$ 1,022	16 [*]

* : Significatif ; ** : Hautement significatif ; NS : Non significatif.

4.4.2. Effet de quelques facteurs physiques et chimiques sur la croissance mycélienne.

4.4.2.1 Effet de la lumière (l'éclairage) sur la croissance mycélienne de *A.rabiei*.

La lumière, est l'un des facteurs physiques testés, il a fait l'objet de plusieurs études pour ses effets quantitatifs et qualitatifs aussi bien dans les conditions naturelles qu'au laboratoire (Khouaidja, 2000). Son action a été montré tant sur la plante hôte que sur le pathogène. La durée d'éclairage semble avoir des effets concrets sur la croissance mycélienne des cinq isolats de *A.rabiei* étudiées.

L'obscurité continue a donné une croissance faible, dont le diamètre varie entre 8 mm et 12,5 mm. Par contre une exposition à une lumière continue a permis d'obtenir une croissance un peu élevée qu'en obscurité, la croissance mycélienne varie entre 9,16 mm et 14,5 mm.

L'exposition sous une photopériode de 12h a donné une meilleure croissance pour l'ensemble des isolats étudiés qui varie entre 14,5 mm et 18,83 mm après 14 jours d'incubation. (Tab.29. Fig.56A e B. Annexe 17).

Tableau 29: Croissance mycélienne des isolats de *A.rabiei* obtenu sous l'effet de la lumière alternée (Photopériode de 12h, Lumière continue et Obscurité continue) (Culture de 14 jours).

Isolats	Croissance mycélienne (Moyenne en mm $\pm$ Ecart-type)		
	Photopériode de 12H Moyenne	Lumière continue Moyenne	Obscurité continue Moyenne
MSC1	14,5 $\pm$ 2,012	10 $\pm$ 0,121	8 $\pm$ 0,133
AT1	12,5 $\pm$ 1,112	9,16 $\pm$ 1,123	8,5 $\pm$ 0,123
SB1	17,5 $\pm$ 2,015	12 $\pm$ 0,152	10 $\pm$ 0,152
MOS1	15,16 $\pm$ 2,123	11,5 $\pm$ 1,136	8,5 $\pm$ 1,136
REL1	18,83 $\pm$ 3,182	14,5 $\pm$ 1,185	12,5 $\pm$ 1,185

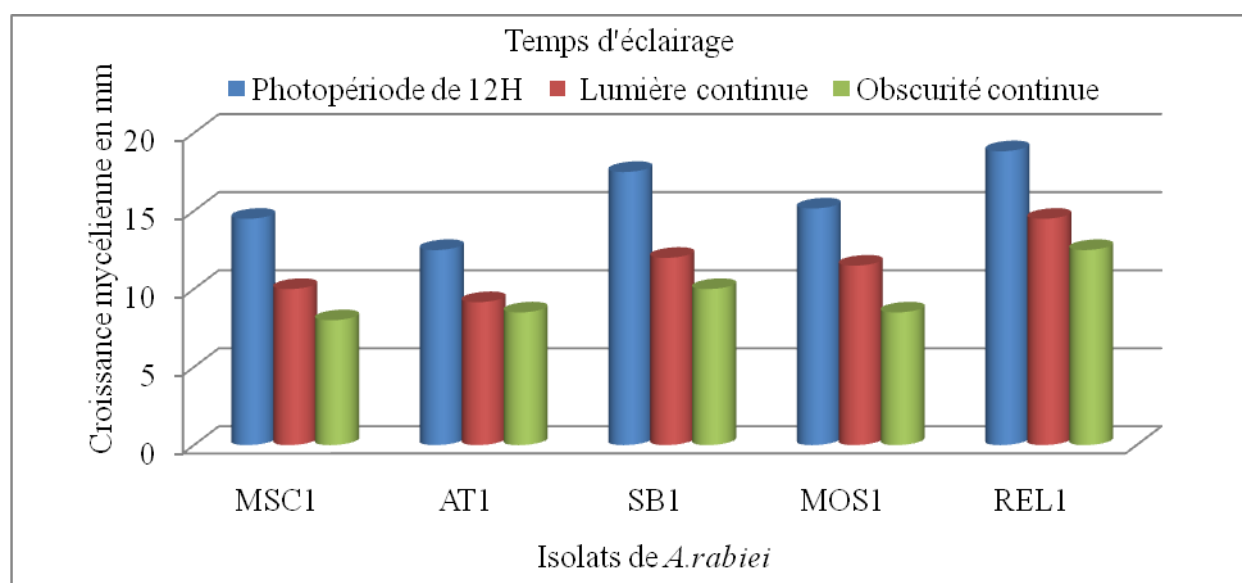


Figure 56A : Effet de la quantité de lumière sur la croissance mycélienne des isolats *A.rabiei* après 14 jours d'incubation

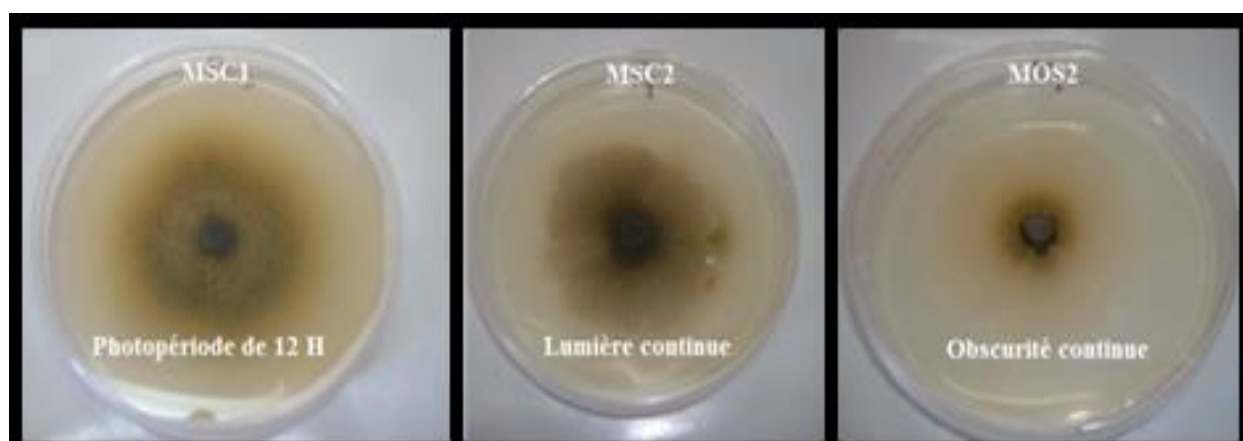


Figure 56B : Aspects des colonies de *A.rabiei* (verso) avec différents durée d'éclairage, après 14 jours d'incubation.

En présence ou en absence d'éclairage, des différences sont significatives concernant

le développement du champignon, ce qui permet de considérer que la lumière est un facteur favorable à la croissance mycélienne. A l'obscurité, la production sporales de nos isolats est faible. En revanche, leur sporulation est plus importante en présence de lumière. La croissance mycélienne est nettement améliorée par l'utilisation d'une photopériode durant l'incubation et de meilleurs résultats sont obtenus avec une photopériode de 12h (Tab.30).

Tableau 30: Analyse de la variance de la croissance mycélienne (culture de 14 jours) obtenus sous l'effet de la lumière alternée (Photopériode de 12 H, Lumière continue et obscurité continue) (Test de Newman –Keuls-Seuil = 5%).

Isolats	Croissance mycélienne (Moyenne en mm $\pm$ Ecart-type)					
	Photopériode de 12H		Lumière continue		Obscurité continue	
	Moyenne	Test F	Moyenne	Test F	Moyenne	Test F
MSC1	14,5 ^a $\pm$ 2,012	55,1 ^{**}	10 ^b $\pm$ 0,121	7,15 [*]	8 $\pm$ 0,133	5,25 ^{NS}
AT1	12,5 ^a $\pm$ 1,112	26 [*]	9,16 $\pm$ 1,123	5,102 ^{NS}	8,5 $\pm$ 0,123	3,302 ^{NS}
SB1	17,5 ^a $\pm$ 2,015	85 ^{**}	12 ^b $\pm$ 0,152	32,102 [*]	10 ^c $\pm$ 0,152	4,122 [*]
MOS1	15,16 ^a $\pm$ 2,123	96,22 ^{**}	11,5 ^b $\pm$ 1,136	18,11 [*]	8,5 $\pm$ 1,136	6,121 ^{NS}
REL1	18,83 ^a $\pm$ 3,182	102,2 ^{**}	14,5 ^b $\pm$ 1,185	28,289 [*]	12,5 ^c $\pm$ 1,185	5.145 [*]

4.4.2.2. Effet de la température sur la croissance mycélienne des isolats de *A.rabiei*.

La température est un des facteurs physiques dont l'action sur la croissance, la sporulation et la propagation des microorganismes aussi bien saprophytes que pathogènes, est très loin d'être contestée.

Une gamme de températures allant de 5°C à 35 °C à été testée, dans le but de déterminer la température optimale ainsi que les températures limitant à la croissance et la sporulation de nos isolats de *A.rabiei* testés (Tab. 31. Annexe 17). La figure (Fig.57A) nous montre que la croissance linéaire est absente à 5°C, elle est réduite mais présente à 15°C, elle va en augmentant chez les isolats testés pour atteindre son optimum à 20°C. Une baisse de la croissance de presque un tiers est relevée chez l'ensemble des isolats dès que la température d'incubation atteint 35°C. Les relevés les plus bas sont obtenus à 35°C. L'aspect général des colonies est affecté par l'action de la température. Des changements de couleur avec des variations dans l'abondance du mycélium sont notés chez les l'ensemble des isolats. L'arrêt de croissance enregistrée à basse température est réversible, car ces mêmes explants, lorsqu'ils sont placés à nouveau dans des conditions favorables reprennent leur rythme de croissance normal (Fig.57B).

Tableau 31: Croissance mycélienne des isolats de *A.rabiei* obtenue sous l'effet de degrés de la température (5°C, 15°C, 20°C, 25°C et 35°C) (Culture de 14 jours).

Isolats	Croissance mycélienne (Moyenne en mm $\pm$ Ecart-type)				
	T°=5°C	T°=15°C	T°=20°C	T°=25°C	T°=35°C
	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Moyenne
MSC1	5 $\pm$ 1	15.5 $\pm$ 1.03	33 $\pm$ 1.22	42.7 $\pm$ 1.77	5 $\pm$ 1
AT1	5 $\pm$ 1	18.5 $\pm$ 1.15	33.2 $\pm$ 1.37	34 $\pm$ 1.11	5 $\pm$ 1
SB1	5 $\pm$ 1	25 $\pm$ 1.25	45.4 $\pm$ 1,82	55.8 $\pm$ 1.45	5 $\pm$ 1
MOS1	5 $\pm$ 1	37.7 $\pm$ 1.36	46.4 $\pm$ 1,55	48.5 $\pm$ 1.37	5 $\pm$ 1
REL1	5 $\pm$ 1	33.2 $\pm$ 1.55	48 $\pm$ 1,85	55.5 $\pm$ 1.42	5 $\pm$ 1

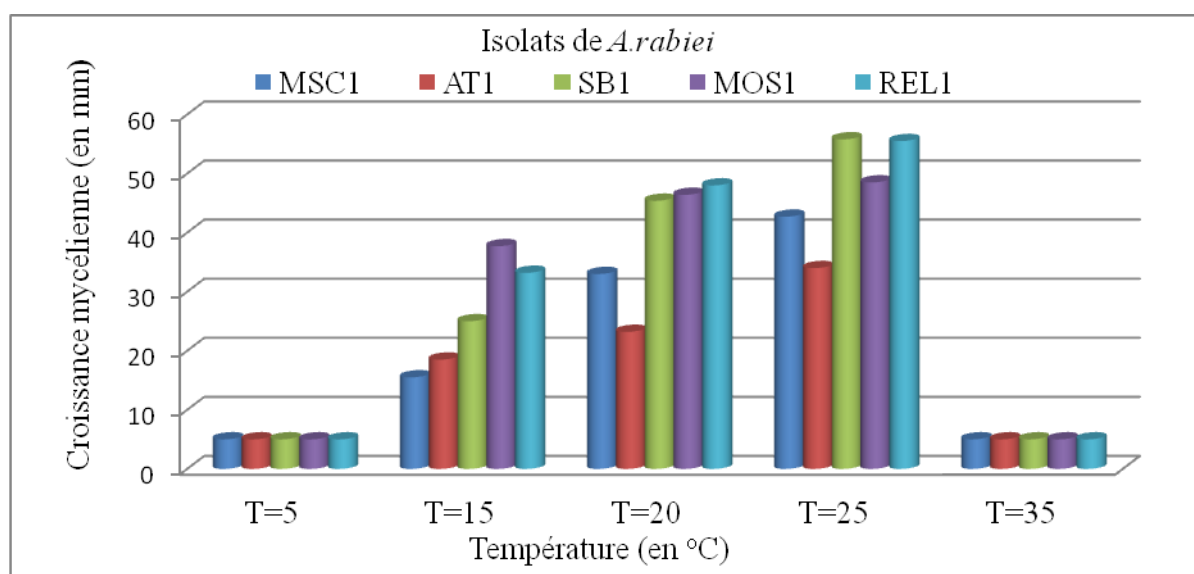


Figure 57A : Effet de la température sur la croissance mycélienne des isolats de *A.rabiei*, après 14 jours d'incubation.

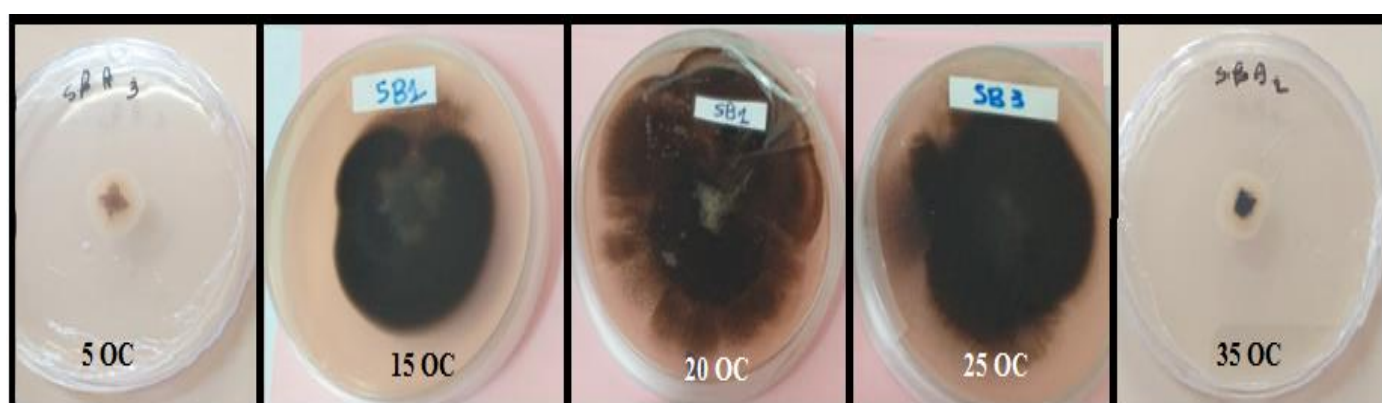


Figure 57B : Aspects des colonies de *A.rabiei* avec différents degrés de température, après 14 jours d'incubation.

La comparaison de la variance des moyennes obtenues à 15 °C, 20 °C et 25°C révèle que les différences enregistrées entre 15°C, 20 °C et 25°C sont significatives. Pour une même

température, le comportement des isolats n'est pas toujours identique, l'importance des différences observées est mentionnée dans le tableau suivant (Tab.32).

Tableau 32: Analyse de la variance de la croissance mycélienne (culture de 14 jours) obtenus sous l'effet de degrés de la température (5°C, 15°C, 20°C, 25°C et 35°C) (Test de Newman –Keuls-Seuil = 5%).

Isolats	Croissance mycélienne (Moyenne en mm ± Ecart-type)									
	T°=5°C		T°=15°C		T°=20°C		T°=25°C		T°=35°C	
	Moy.	Test F	Moy.	Test F	Moy.	Test F	Moy.	Test F	Moy.	Test F
MSC1	5 ± 1	4.22 ^{NS}	15.5 ^a ± 1.03	95.2 [*]	33 ^b ± 1.22	112 ^{**}	42.7 ^c ± 1.77	259 ^{**}	5 ± 1	4.22 ^{NS}
AT1	5 ± 1	4.22 ^{NS}	18.5 ^a ± 1.15	112.1 [*]	33.2 ^b ± 1.37	98.2 ^{**}	34 ^c ± 1.11	94 [*]	5 ± 1	4.22 ^{NS}
SB1	5 ± 1	4.22 ^{NS}	25 ^a ± 1.25	124.01 [*]	45.4 ^b ± 1.82	212 ^{**}	55.8 ^c ± 1.45	223 ^{**}	5 ± 1	4.22 ^{NS}
MOS1	5 ± 1	4.22 ^{NS}	37.7 ^a ± 1.36	155.4 [*]	46.4 ^b ± 1.55	201.2 ^{**}	48.5 ^c ± 1.37	198 ^{**}	5 ± 1	4.22 ^{NS}
REL1	5 ± 1	4.22 ^{NS}	33.2 ^a ± 1.55	133.12 [*]	48 ^b ± 1.85	95 [*]	55.5 ^c ± 1.42	312 ^{**}	5 ± 1	4.22 ^{NS}

4.4.2.3. Etude de l'effet du pH sur la croissance mycélienne des isolats de *A.rabiei*.

Un bon développement mycelien a été observé au pH 5.5 et la croissance mycélienne maximale a été observée pour l'isolat REL1 (30.5 mm), suivi de l'isolat MSC1 (28.5mm).

En l'éloignant de part et d'autre de cette limite, la croissance de l'ensemble de nos isolats commence à baisser. Le pH neutre et alcalin (pH7 et pH8) sont moins favorable à la croissance mycélienne des isolats testés, dont la croissance est variée entre 14 mm et 18.5 mm (pH 7) et entre 10 mm et 14.5 mm (pH 8). Le pH légèrement acide est donc plus favorable à la croissance du pathogène. Pour le pH acide (pH 4) nous avons remarqué une faible croissance mycélienne du pathogène, qui varie entre 6.5 mm et 8 mm (Tab.33. Fig.58A. Annexe 17). Les isolats prennent le même aspect cultural; les colonies sont blanchâtres pour les différents isolats testés, avec une abondance d'un mycélium aérien (Fig.58B).

Tableau 33: Croissance mycélienne des isolats de *A.rabiei* obtenue sous l'effet de différents pH (pH 4, pH 5.5, pH 7 et pH 8) (Culture de 14 jours).

Isolats	Croissance mycélienne (Moyenne en mm ± Ecart-type)			
	pH 4	pH 5.5	pH 7	pH 8
	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Moyenne
MSC1	8 ± 1.11	28.5 ± 1.25	18 ± 1.15	12 ± 1.05
AT1	7.5 ± 1.05	26 ± 1.25	14 ± 1.13	10 ± 1.01
SB1	7.5 ± 1.02	25 ± 1.55	15.5 ± 1.25	12 ± 1.05
MOS1	6.5 ± 1.10	26.5 ± 1.36	18.5 ± 1.27	14.5 ± 1.10
REL1	8 ± 1.03	30.5 ± 1.45	15.5 ± 1.12	10 ± 1.01

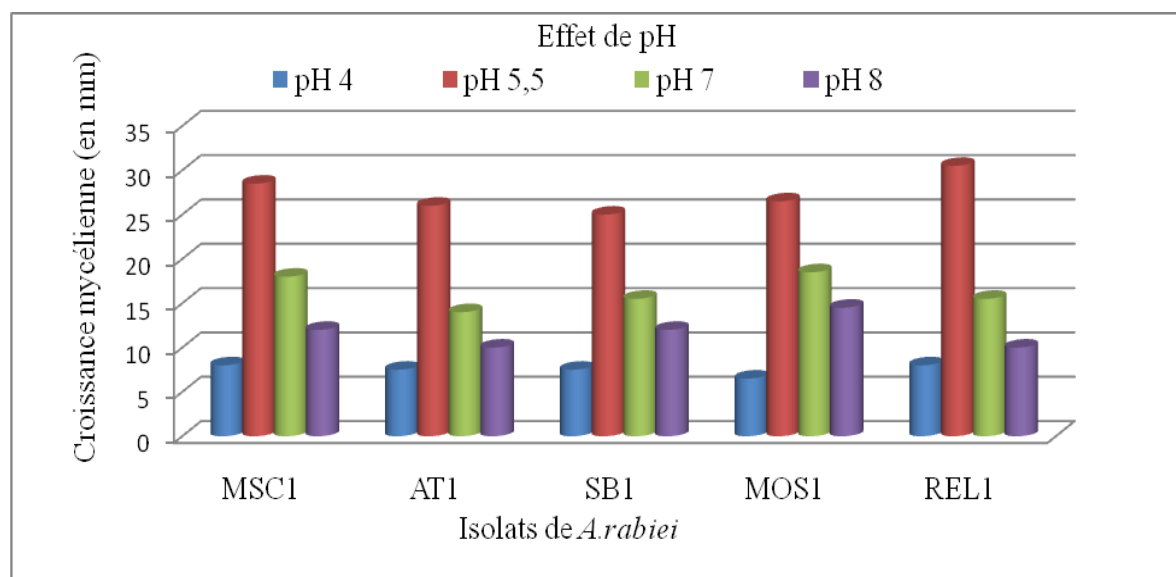


Figure 58A : Effet de différents pH sur la croissance mycélienne des isolats de *A.rabiei*, après 14 jours d'incubation.

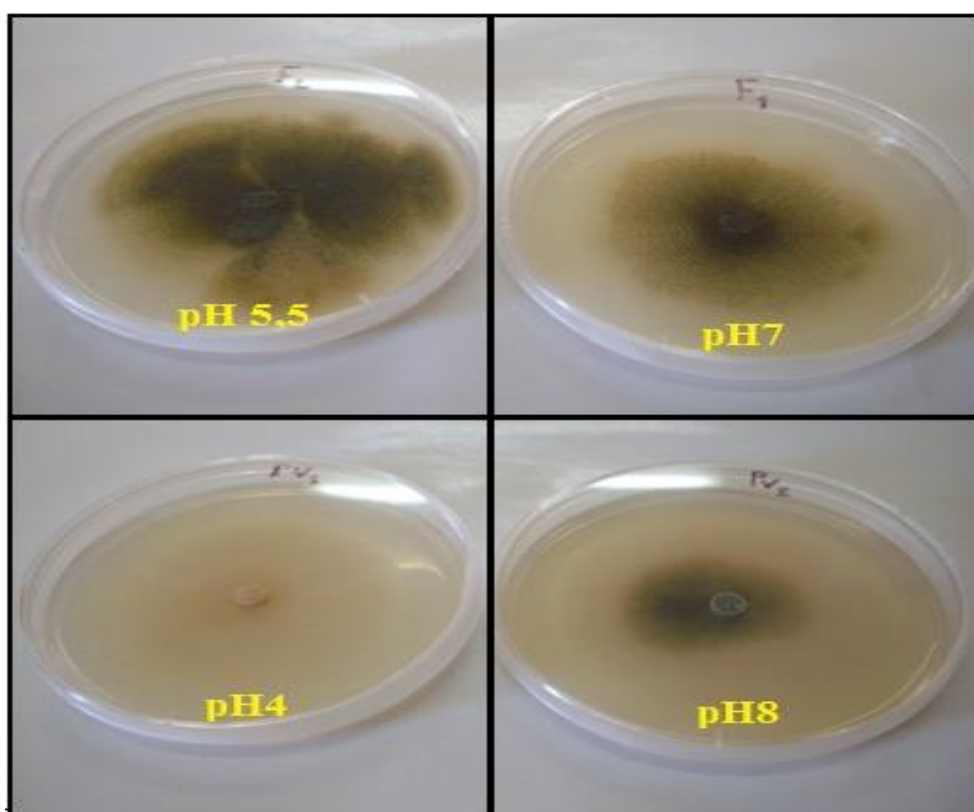


Figure 58B : Aspects des colonies de *A.rabiei* (verso) avec différents pH, après 14 jours d'incubation.

A travers les résultats obtenus, nous constatons que l'effet du pH est variable, avec des

différences significatives, hautement significatives et non significatives entre les isolats testés.

L'étude statistique de la croissance mycélienne en fonction du pH a permis l'obtention de meilleurs résultats (analyse de la variance, test Newman-Keuls-Seuil= 5%), les différences enregistrées sont significatives et les degrés de signification sont représentées dans le tableau suivant (Tab.34).

Tableau 34. Analyse de la variance de la croissance mycélienne (culture de 14 jours) en fonction du pH (pH 4, pH 5.5, pH 7 et pH 8) (Test de Newman –Keuls-Seuil = 5%).

Isolats	Croissance mycélienne (Moyenne en mm $\pm$ Ecart-type)							
	pH 4		pH 5.5		pH 7		pH 8	
	Moy.	Test F	Moy.	Test F	Moy.	Test F	Moy.	Test F
MSC1	8 $\pm$ 1.11	6.12 ^{NS}	28.5 ^a $\pm$ 1.25	102.02 ^{**}	18 ^b $\pm$ 1.15	95.21 [*]	12 ^c $\pm$ 1.05	33.12 [*]
AT1	7.5 $\pm$ 1.05	5.01 ^{NS}	26 ^a $\pm$ 1.25	120.11 ^{**}	14 ^b $\pm$ 1.13	75.02 [*]	10 $\pm$ 1.01	9.23 ^{NS}
SB1	7.5 $\pm$ 1.02	5.11 ^{NS}	25 ^a $\pm$ 1.55	95.23 [*]	15.5 ^b $\pm$ 1.25	97.21 [*]	12 ^c $\pm$ 1.15	35.25 [*]
MOS1	6.5 $\pm$ 1.10	4.21 ^{NS}	26.5 ^a $\pm$ 1.36	124.12 ^{**}	18.5 ^b $\pm$ 1.27	95.03 [*]	14.5 ^c $\pm$ 1.10	52.14 [*]
REL1	8 $\pm$ 1.03	6.03 ^{NS}	30.5 ^a $\pm$ 1.45	129.03 ^{**}	15.5 ^b $\pm$ 1.12	95.11 [*]	10 $\pm$ 1.01	9.25 ^{NS}

4.4.3. Discussion

L'étude physiopathologique des isolats de *A. rabiei* a permis de mettre en évidence une variabilité physiologique entre les isolats.

Effectivement des différences très significatives ont été observées dans leur comportement (croissance mycelienne) en fonction du milieu de culture.

Suite aux résultats obtenus il s'avère que le milieu CSMDA est le plus favorable à la croissance mycélienne des isolats étudiés. Ces dernières développent bien sur ce milieu riche en composés organiques et en minéraux.

Nos résultats sur l'aspect du mycélium et la couleur du cirrhe, concordent avec ceux obtenus par Khouaidjia (2000).

Bouznad (1978), rapporte lors de ces travaux sur les différents isolats les mêmes résultats en citant que le milieu CDA représente un substrat très favorable à la croissance et la sporulation de *A. rabiei*.

Khouaidjia (2000), a étudié l'influence de six différents milieux de cultures à savoir (Mathur, Czapek, Richard, Bompeix, CSMDA et PDA), sur la croissance mycélienne et la sporulation des isolats de *A. rabiei*. Un faible développement de ces derniers a été observé sur

deux milieux d'origine minérale (Czapek et Richard) sur le quel la sporulation a atteint les valeurs les plus basses. Le même auteur a obtenu des colonies avec un aspect très cotonneux. Aussi Khouaidjia en 2000, a montré que les milieux Mathur, CSMDA et PDA, sont les plus favorables à la croissance mycélienne et à la sporulation du champignon ce qui corroborent nos observations sur le développement de *A.rabiei* sur les milieux CSMDA et PDA).

Les milieux CSMDA et PDA contiennent des extraits naturels qui ont un effet très positif sur *A.rabiei* en améliorant sa croissance et sa sporulation (El Biari, 1995).

Il a été noté que les optima de croissance linéaire et de la sporulation ne sont pas obtenus sur un même milieu. Le milieu CSMDA a favorisé dans l'ensemble une bonne croissance linéaire avec une sporulation très proche de l'optimum. Le milieu CSMDA que nous avons utilisé, a permis aux isolats de produire un maximum de spores avec une croissance mycélienne importante. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Benzohra (2009), Khouaidjia (2000), Kaiser (1973), Singh et *al.* (1993) et El Biari (1995).

D'autres chercheurs ont montré que le milieu pois chiche CSMDA (Chickpea-Seed-Meal Dextrose Agar), favorise une bonne croissance mycélienne et une sporulation importante (Basandrai et *al.*, 2005 ; Bayraktar et *al.*, 2007).

Kong et *al.*, (1990) en étudiant le comportement de *Alternaria helianthi*, agent de l'anthracnose du tournesol sur différents milieux de culture, ont remarqué que la croissance mycélienne et la sporulation du pathogène augmentent lorsque le champignon est cultivé sur le substrat de son hôte, et c'est ce que nous avons observé chez *A.rabiei*. Par conséquent nous le recommandons comme milieu spécifique pour la croissance et la sporulation de ce champignon.

La croissance mycélienne et la sporulation des champignons peuvent être affectés par des facteurs internes au pathogènes relatifs à sa constitution génétique, comme elles peuvent dépendre d'un certain nombre de facteurs externes tels que la température, la lumière, le pH, l'humidité relative.... etc.

Lors de la présente étude l'effet de trois facteurs du milieu (la lumière, le pH et la température) sur le comportement des isolats de *A.rabiei* ont été étudiés.

La lumière, en tant que facteur physique du milieu, est reconnue pour son influence sur la formation des structures de reproduction, les pigments de biosynthèse et le phototropisme

(Tadashi, 1988; Khouaigja, 2000). L'exposition des cultures de *A.rabiei* à une lumière blanche pendant des durées variables a influencé énormément la croissance mycélienne et les caractères culturels des colonies. Aussi lors de l'éclairage continu et l'obscurité continue une baisse dans la croissance mycélienne comparativement à la photopériode de 12h a été enregistré. L'alternance d'une phase obscure avec une phase éclairée a permis une amélioration des résultats chez les isolats testés. Lors de nos essais, nous avons constaté que la durée d'exposition des cultures à la lumière joue un rôle considérable sur la densité de la sporulation. Il est reconnu que certains champignons exigent un apport de lumière pour la stimulation de leur sporulation en plus d'une période suffisante d'obscurité, pour que le processus de formation de spores se déclenche et s'achève. En plus de son action sur la croissance, la lumière peut avoir aussi d'autres actions sur les champignons (Hafiz, 1951). Allen (1983) dans son étude sur les conidies de *Alternaria helianthi* a remarqué que la lumière artificielle n'a pas d'effet significatif sur la germination des conidies de ce pathogène, mais elle peut entraîner une augmentation du nombre de tubes germinatifs par conidie ainsi qu'une activation de la croissance mycélienne.

La couleur des colonies fongiques peut aussi être affectée par la présence ou non de la lumière. Hawker (1950) a signalé que les colonies exposées sont généralement beaucoup plus colorées par rapport aux autres, c'est ce que nous avons remarqué chez les isolats de *A.rabiei*. L'alternance d'éclairage nous a permis de remarquer la présence du phénomène de zonation. Hafiz (1951) en cultivant différents isolats de *A.rabiei* sous un cycle d'éclairage alternatif, a remarqué l'absence de zonation dans les colonies de certains isolats, ce phénomène n'est apparu chez ces dernières que lorsque l'alternance de la lumière est accompagnée d'une fluctuation des températures d'incubation. Dans notre essai comme pour Kaiser (1973) et El Biari (1995) le phénomène de zonation est observé pour l'alternance lumière / obscurité mais disparaît lorsque les cultures sont incubées sous un éclairage continu ou une obscurité continue.

La température, comme la lumière est un facteur physique de l'environnement, qui a une influence significative et limitant sur la croissance et la germination des spores. Les résultats que nous avons obtenus avec l'ensemble de nos isolats de *A.rabiei*, révèlent que les meilleures moyennes de la croissance sont enregistrés entre 20°C et 25°C.

La baisse température allant jusqu'à 5°C est moins néfaste pour le pathogène que les hautes températures, puisqu'à partir de 35°C l'arrêt de croissance devient irréversible. Ces

résultats concordent avec ceux de plusieurs d'auteurs, qui confirment que la température optimale pour la croissance mycélienne et la germination des spores chez les isolats de *A.rabiei* se situe au environ de 20°C avec les limites inférieures et supérieures 0-15°C et 30 - 35°C (Khouaidjia, 2000 ; Nene et *al.*, 1987).

Les travaux réalisés sur l'épidémiologie de la maladie l'antracnose confirment que la température de l'efficacité de l'infection est de 20°C (Weltziew et *al.*, 1984 ; Labdi,1995). L'infection par *A.rabiei* n'a pas lieu lorsque les températures sont de 10°C et 30°C. Quinn (1982) dans son étude sur l'effet de certains facteurs physiques sur le développement de l'*Oïdium begoniae* a observé qu'entre 23°C et 28°C, la germination des spores de ce pathogène est forte et rapide, mais dès qu'elle s'approche de 30°C l'austoria ne se forma plus. Il est connu aussi que selon les températures d'incubation des variations peuvent apparaitre au sein des caractères cultureux. Hafiz (1951) fait les mêmes constatations sur des isolats de *A.rabiei* provenant du pakistan.

Les champignons peuvent croitre de façon maximale en présence de certaines valeurs de pH du milieu de culture. Ces valeurs varient selon les groupes fongiques des champignons phytopathogènes par exemple, exigent pour leur croissance des valeurs de pH se situant entre 5 et 6.5 (Cochrane, 1985). Ces résultats se rapprochent de ceux de Regnault (1990), qui a montré que la plupart des champignons se développent à un pH compris entre 2 et 9. Pour l'ensemble des isolats de *A.rabiei* que nous avons testés, les optimales de croissance sont relevés lorsque les valeurs initiales du pH est de 5.5 et légèrement pour pH 7. La croissance a diminué de façon significative en présence des pH alcalins. L'acidité est plus tolérée par nos isolats, ceci est commun à une large gamme de champignons. L'intolérance à l'acidité est par contre un phénomène limité à très peu de groupes microbiens, telles que les espèces de *Streptomyces*.

IV.5. Test de l'efficacité des fongicides systémiques sur la croissance mycélienne de *A. rabiei*

4.5.1. Test *In vitro* pour le contrôle chimique de *A.rabiei*

Cette étude vise à tester l'effet *in vitro* du bénomyl et du carbendazime sur la croissance mycélienne des isolats de *A. rabiei* . L'évaluation de l'efficacité de ces deux fongicide est basée sur le calcul du taux d'inhibition de la croissance mycélienne.

Une faible croissance mycélienne des isolats testés par rapport au témoin a été observée. Effectivement les résultats obtenus indiquent que les deux produits affectent la croissance mycélienne des isolats du champignon selon différentes doses testées pour ces fongicides et en fonction de l'isolat.

L'évaluation de l'efficacité des fongicides testés sur le calcul du taux d'inhibition de la croissance mycélienne, nous observons que la croissance mycélienne de nos isolats est inférieure par rapport au témoin (Figures 59A, B et C. Annexe 18).

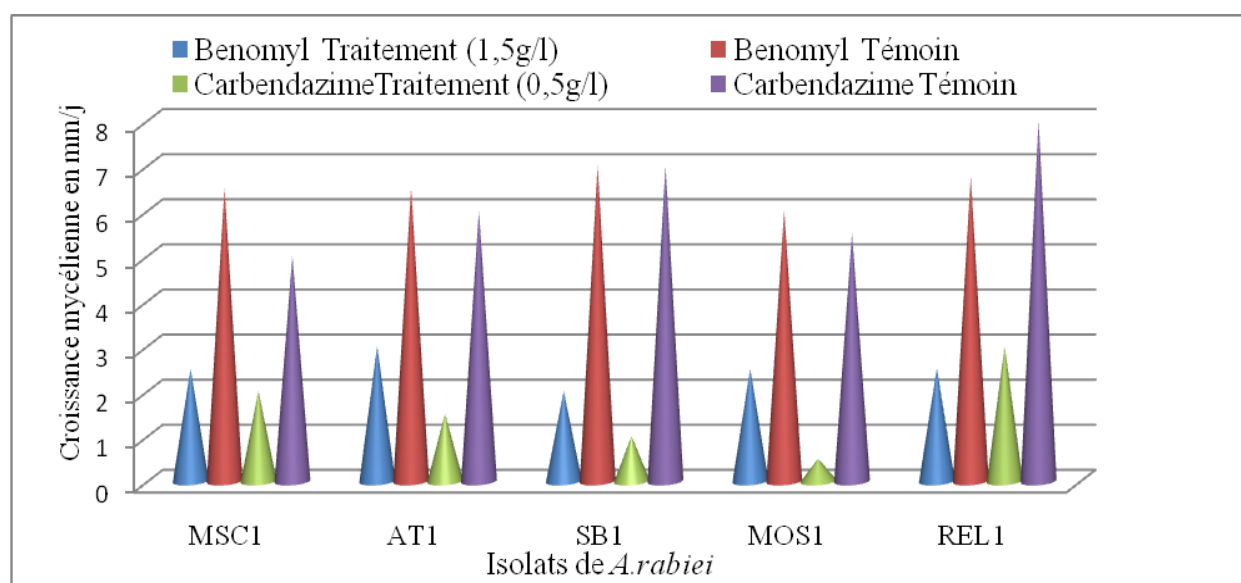


Figure 59A. Effet *In vitro* des fongicides (Benomyl et Carbendazime) sur la croissance mycélienne des isolats de *A. rabiei* (culture de 10 jours)

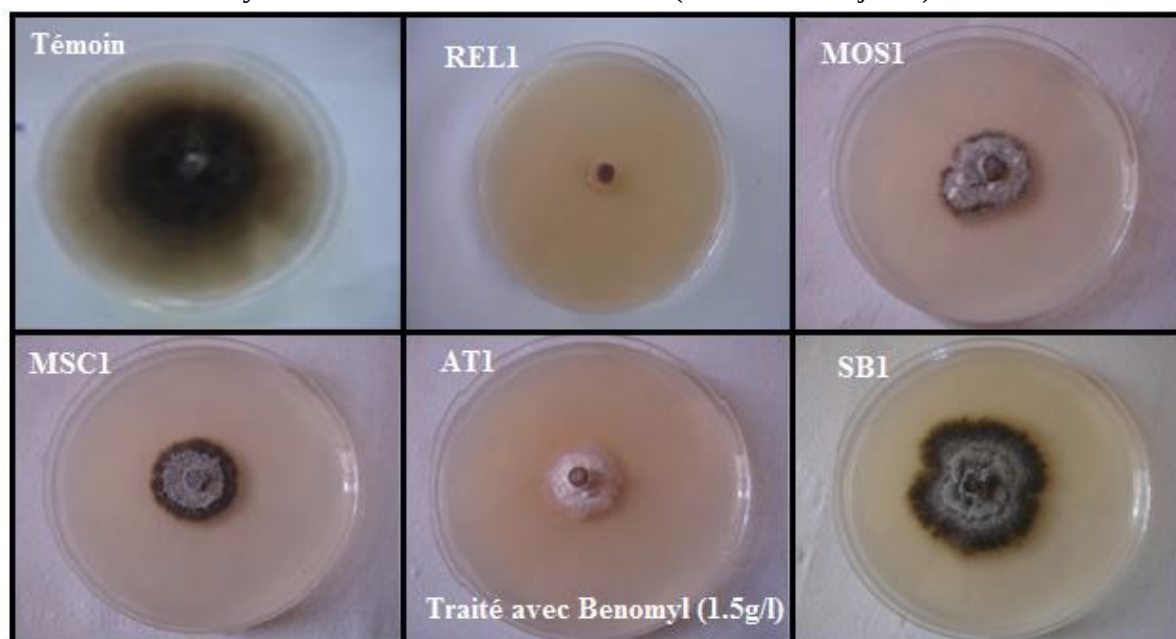


Figure 59B. Aspects des colonies de *A. rabiei* sous l'effet de Benomyl sur la croissance mycélienne à la concentration 1.5g/l, après 10 jours d'incubation.

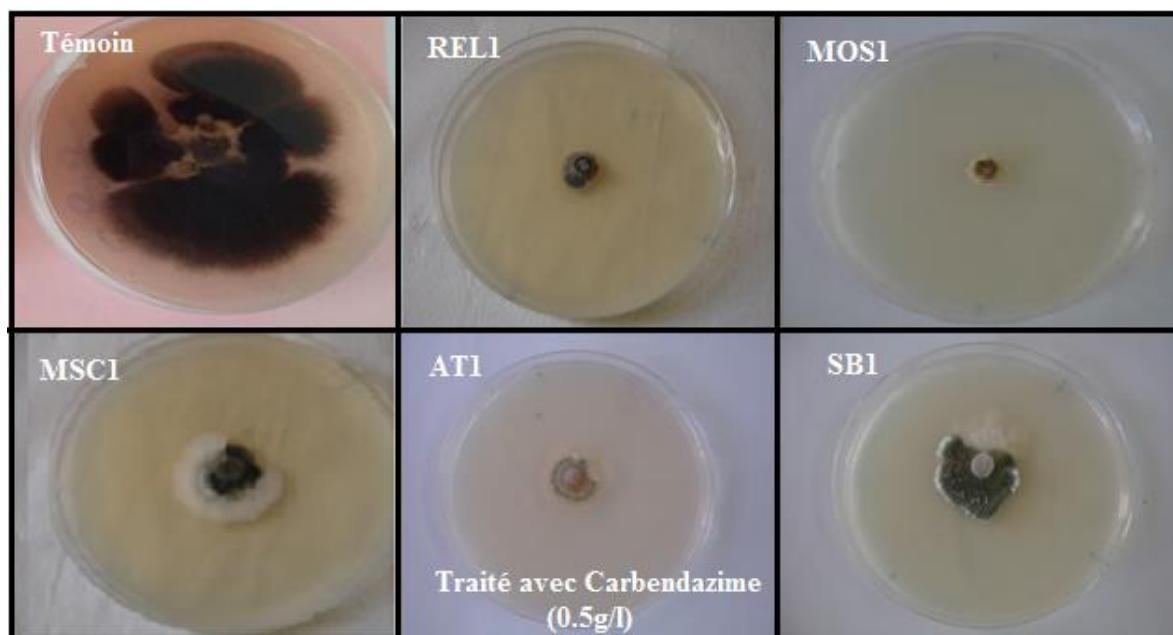


Figure 59C. Aspects des colonies de *A.rabiei* sous l'effet de Carbendazime sur la croissance mycélienne à la concentration 0.5g/l, après 10 jours d'incubation.

En effet, le taux d'inhibition de la croissance mycélienne (TI%) est très important pour les isolats, il varie entre 48% et 90,47%. Un taux élevé d'inhibition avec le fongicide carbendazime a été enregistré donnant une inhibition qui varie entre 52,38 % et 90,47 % selon l'isolat, alors que pour le benomyl ce taux varie entre 48 % et 60 % (Fig.60. Annexe 18).

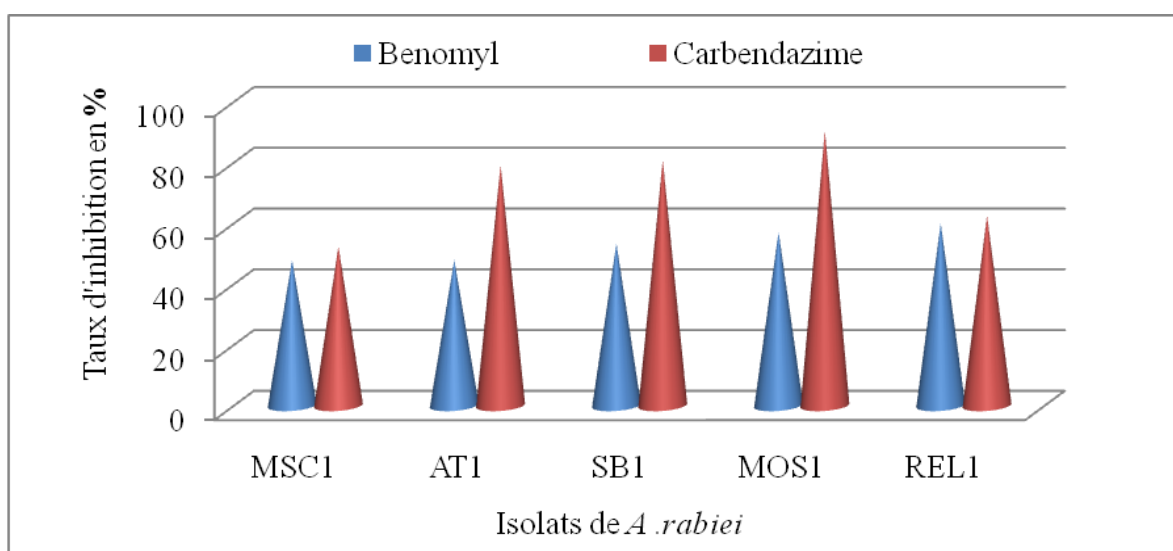


Figure 60. Taux d'inhibition (TI en %) de la croissance mycélienne de *A.rabiei* sous l'effet du Benomyl et Carbendazime.

Les résultats obtenus sur l'évaluation *In vitro* et *In vivo* des fongicides nous ont permis d'observer la viabilité de ce test en fonction du coefficient de variation (CV) (Tab.35), et l'analyse de variance (ANOVA) a révélé une interaction significative dont la probabilité "P"

est inférieure à 0,01 ($p < 0,01$) entre les deux fongicides testés et les isolats de *A.rabiei* étudiés.

Tableau 35. Analyse de la variance des isolats en fonction des moyennes de croissance mycélienne de *A.rabiei* sous l'effet du bénomyl et de la carbendazime (test de Newman-Keuls = 5%).

Isolats	Croissance mycélienne (mm/j) (Moy $\pm$ σ)							
	Benomyl				Carbendazime			
	Traité	Témoin	Test F	C.V.	Traité	Témoin	Test F	C.V.
MSC1	3.25 ^b $\pm$ 0.5	6.25 ^a $\pm$ 0.5	53.5**	19.15%	2.5 ^b $\pm$ 0.5	5.25 ^a $\pm$ 0.5	98**	13.8%
AT1	3.25 ^b $\pm$ 0.5	6.25 ^a $\pm$ 0.5	17.8**	14.12%	1.15 ^b $\pm$ 0.5	5.5 ^a $\pm$ 0.5	145**	9.25%
SB1	3.5 ^b $\pm$ 0.5	7.5 ^a $\pm$ 0.5	98.4**	11.72%	1.25 ^b $\pm$ 0.5	6.5 ^a $\pm$ 0.5	154**	11.5%
MOS1	2.25 ^b $\pm$ 0.5	5.25 ^a $\pm$ 0.5	255**	16.5%	0.5 ^b $\pm$ 0.5	5.25 ^a $\pm$ 0.5	223**	11.25%
REL1	2.5 ^b $\pm$ 0.5	6.25 ^a $\pm$ 0.5	165**	8.75%	3 ^b $\pm$ 0.5	8 ^a $\pm$ 0.5	125**	14.25%

C.V. : Coefficient de variation ; σ : Ecart-type ; Moy : Moyenne de croissance mycélienne ; * : Significatif ;

** : Hautement significatif

4.5.2. Test *In vivo* pour le contrôle chimique de *A.rabiei*

Les fongicides testés ont montré une efficacité dans la réduction de la sévérité de l'anthracnose par rapport aux témoins (Tab.36, Fig.61A. Annexe 19), avec un pourcentage de réduction qui varie entre 29 % et 78 %. Nous avons constaté que le fongicide systémique carbendazime a été capable de réduire la gravité de l'anthracnose entre 60 % et 78 % avec une réduction de 73% en moyenne, par rapport au bénomyl a un taux de réduction varie entre 29 % et 50% avec une réduction moyenne de 41% (Fig.61B), à partir de ces résultats, nous pouvons dire que les fongicides pénétrants (systémiques) ont la capacité de réduire la croissance des pathogènes des plantes (Fig.62)

Tableau 36. Réduction de l'incidence de l'anthracnose (RIM %) sur les trois lignées de pois chiche sous l'effet du bénomyl et du carbendazime.

Fongicides utilisés	Benomyl (1.5g/l)			Carbendazime (0.5 g/l)		
Isolats / Lignées	Col08	F1025	ILC482	Col08	F1025	ILC482
MSC1	41%	29%	43%	74%	76%	75%
AT1	39%	42%	42%	60%	73%	74%
SB1	50%	40%	42%	75%	78%	71%
MOS1	34%	40%	38%	75%	65%	72%
REL1	44%	43%	44%	70%	70%	70%
RM (%)		41 %			73 %	

RM. Réduction moyenne en %.

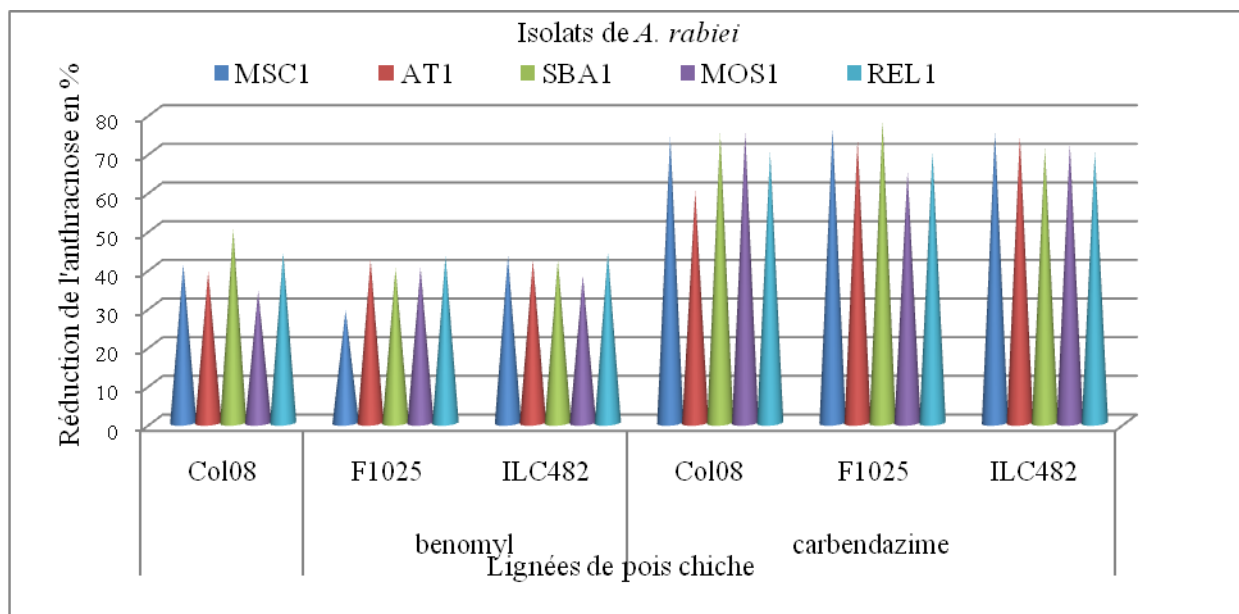


Figure 61A. Réduction de la sévérité de l'antracnose (en %) du pois chiche sous l'effet de Benomyl et Carbendazime.

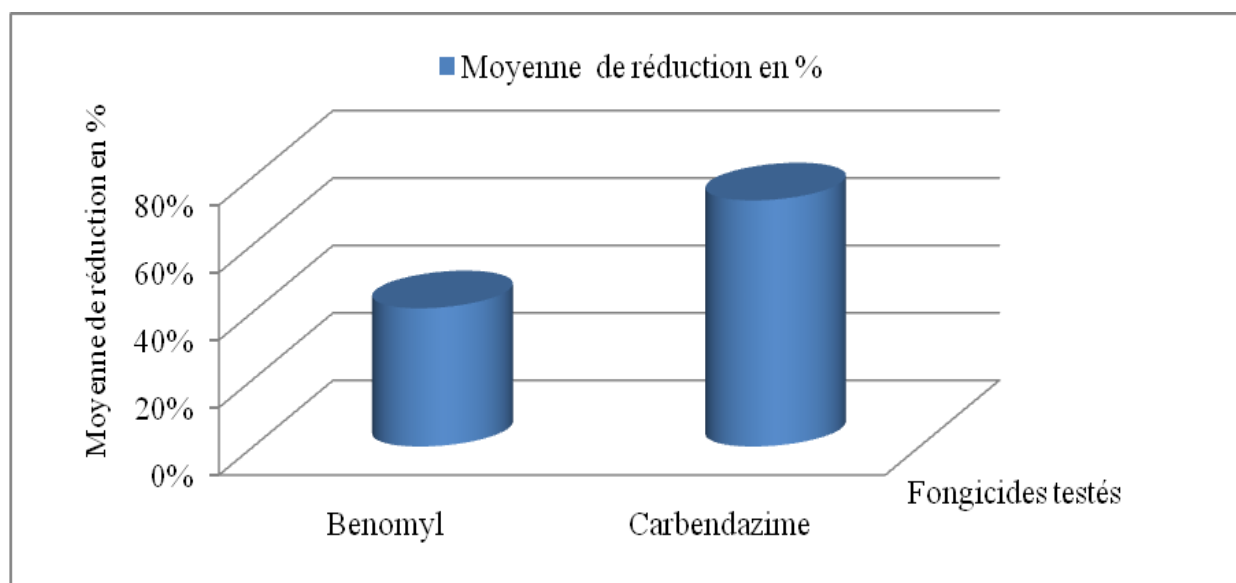


Figure 61B. Réduction moyenne de la sévérité de l'antracnose (en %) de pois chiche sous l'effet de Benomyl et Carbendazime.

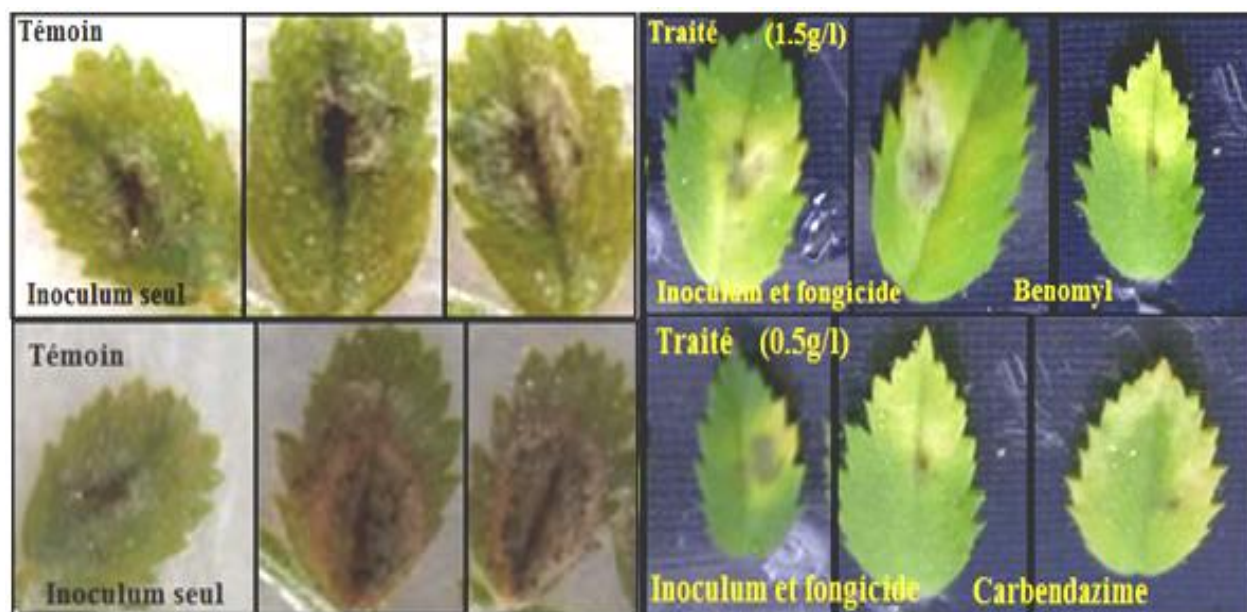


Figure 62: Symptômes de *A. rabiei* sur folioles de pois chiche sous l'effet de deux fongicides (Benomyl et Carbendazime)

4.5.3. Discussion

L'étude de l'effet *In vitro* et *In vivo* des fongicides systémiques du groupe des benzimidazoles (Benomyl et Carbendazime) sur *A.rabiei*, nous a permis de constater une différence significative au niveau de l'efficacité de ces deux fongicides sur la croissance mycélienne des isolats de *A .rabiei* étudiées. Nous avons remarqué que la majorité des isolats étudiés sont sensibles aux fongicides testés. L'étude macroscopique montre que la croissance mycélienne des différents isolats choisis est affectée par les différentes concentrations de deux fongicides testés.

Effectivement, il a été mis en évidence l'action inhibitrice de la matière active sur la croissance mycélienne de la majorité des isolats étudiés à l'exception de trois isolats à savoir AT1, MSC1 et SBA1. Nos résultats diffèrent de ceux de Gaur (2003) qui a rapportés que la croissance mycélienne de *A. rabiei* est affectée par les différentes concentrations de Tridemorphe et Manebe. Lors de notre travail, il a été démontré que le carbendazime est plus efficace sur *A. rabiei* par rapport au benomyl. Il s'avère aussi que certains isolats (AT1, MSC1 et SBA1) ont une certaine résistance au Benomyl alors que d'autres isolats (REL1 et MSC1) ont présenté une résistance vis à vis au carbendazime.

Plusieurs travaux ont rapporté l'effet *in vitro* et *in vivo* des fongicides sur la croissance mycélienne et la sporulation de *A.rabiei*., alors que certains auteurs ont rapporté les potentialités du benomyl, ainsi que le crédit sur la croissance mycélienne (Gossen, 2004;

Hibar et *al.*, 2007). D'autres chercheurs ont montré que le Chlorothalonil a une efficacité d'inhibition de la germination des spores ainsi que sur la croissance mycélienne (Bahous et *al.*, 2005; Shtienberg et *al.*, 2000; Bashir et *al.*, 1987). Il s'agit du blocage de plusieurs enzymes et coenzymes intervenant au cours du processus respiratoire, ce produit à une action préventive et possède un large spectre d'activité (Chaudhry et *al.*, 2009). Les études ont démontré l'efficacité du carbendazime (Triparthi et *al.*, 1987, Bashir et *al.*, 1987), tandis que Bahous et *al.*, 2005 ont également rapporté l'efficacité de ce fongicide, cependant lorsque la maladie devient épidémique avec un taux d'infection élevé au départ, le traitement devient moins efficace. Les résultats de Bashir et Ilyas (1986) sur une expérience en tube à essai du fongicide Thiabendazole à différentes concentrations sur la croissance mycélienne de *A. rabiei*. Le mancozèbe (Dithane) testé au Canada pour lutter contre la phtisie des mineurs du pois chiche, est inefficace (Chongo et *al.*, 2003). Les fongicides du groupe des Strobilurines, comme l'Azoxystrobine et la Pyraclostrobine, ont été étudiés au Canada ces dernières années, les chercheurs ont remarqué que la matière active, l'Azoxystrobine, est efficace contre *A. rabiei* (Demirci et *al.*, 2003; Armstrong-cho et *al.*, 2008, Benzohra et *al.*, 2015). Des résultats similaires ont été obtenus par Reddy et Singh, 1984; Demirci et *al.*, (2003). D'autres chercheurs ont montré que les fongicides (Carbendazime et Thiabendazole) ont une efficacité d'inhibition de la germination des spores de *A. rabiei* (Reddy et Singh, 1984; Demirci et *al.*, 2003). D'autres auteurs montrent qu'*in vitro* et *in vivo*, le thiabendazole et le bénomyl ont un effet significatif sur la croissance mycélienne et l'inhibition de la germination des spores de *A. rabiei*. En étudiant l'effet d'autres fongicides de la même famille chimique sur la croissance mycélienne de *A. rabiei*, Chang et *al.*, (2007) ont montré que les dithiocarbamates (comme le manèbe) et les strobilurines (comme l'azoxystrobine) sont plus efficaces sur la croissance mycélienne de *A. rabiei*. Dans notre essai, nous avons trouvé un taux d'inhibition significatif de la croissance mycélienne (48% à 60%) des isolats de *A. rabie* sous l'effet du bénomyl. L'efficacité de l'inhibition de la croissance mycélienne par les fongicides bénomyl et chlorothalonil a été rapportée par Daayf et Platt (2002) sur *Phytophthora infestans*, l'agent causal du mildiou de la pomme de terre, avec un taux d'inhibition de 70%. Cette inhibition a été obtenue dans notre essai sur l'isolat de Sidi Bel Abbès (SB1) avec un taux de 79,09%. Le taux d'inhibition (TI%) est très important sur la croissance mycélienne des isolats, il varie entre 30 % et 72 %, avec une inhibition importante pour le fongicide bénomyl qui permet une inhibition entre 48 % et 90,47 % selon l'isolat, puis la carbendazime un taux varie entre 55,38 % et 90,47 %.

Ces fongicides systémiques du groupe des benzimidazoles (bénomyl, carbendazime et thiabendazole) empêchent la formation des microtubules, où ils forment un complexe avec la tubuline. Cette étude a révélé que les deux fongicides systémiques (bénomyl et carbendazime) sont efficaces sur la croissance mycélienne de *A. rabiei*. De même, de ces fongicides sur d'autres maladies fongiques, a été rapporté sur plusieurs parasites tels que *Rhizoctonia solani*, agent de la brûlure des feuilles du riz (*Oryza sativa*) (Obanor et al., 2005). Dans notre essai, nous avons trouvé un taux de réduction le plus élevé 78% pour l'isolat SB1 qui varie de 60% à 78% de réduction des symptômes sous l'effet du carbendazime selon l'isolat et lignées testées avec une moyenne de réduction de 73%. Le benomyl a montré un taux de réduction le plus élevé de 50% pour l'isolat de Sidi Bel Abbès (SB1), le taux varie entre 29 % et 50% avec une moyenne de réduction de 41%.

Le fongicide benomyl a été capable de réduire jusqu'à 48% le développement de la brûlure du concombre (*Cucumis sativus* L.) causée par *Pseudoperonospora cubensis* (Chaudhry et al., 2009), et jusqu'à 60% le développement de la brûlure du poivron (*Capsicum annuum*) causée par *Phytophthora capsici*. Par contre, nos résultats ne semblent pas confirmer ces résultats sur *A. rabiei* (41% de réduction moyenne). Le chlorothalonil provoque une action inhibitrice de 50% sur *Uromyces phaseoli*, agent de la rouille du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) (Pohronezny et al., 1987). Ces résultats sont proches des niveaux que nous avons obtenus sur l'anthracnose du pois chiche (41%).

L'étude de l'effet de deux produits de la famille de benzimidazole sur *Ascochyta rabiei*, agent de l'anthracnose de pois chiche permis de mettre en évidence l'efficacité de ces deux produits (benomyl et carbendazime) dans le contrôle de la maladie d'où la nécessité de l'introduire dans les programmes de stratégie de lutte.

IV.6. Identification moléculaire des isolats de *A.rabiei*

4.6.1. Analyse de la pureté de l'ADN

Les différentes extractions d'ADN réalisées sur les isolats étudiées donnent lieu à une variation de leur concentration ainsi qu'à des rapports 260/280 selon les isolats. Le rapport 260/280 détermine la qualité de l'ADN extrait, étape importante pour obtenir des bandes électrophorétiques nettes pour la suite des études sur le séquençage des régions ITS. Nous avons d'abord vérifié la pureté de l'ADN pour chaque isolat étudiée pour avoir une bonne pureté d'ADN extrait.

4.6.2. Séquençage des régions ITS

Les bandes des ADNr de nos isolats de *Ascochyta* de pois chiche ont été utilisés pour établir l'identité des isolats testés et déterminées par les caractéristiques morpho-culturelles. L'amplification de l'ADNr avec une paires d'amorces universelles ITS1 et ITS4 ont été analysées par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, des bandes similaires ont obtenues pour toutes les souches étudiées, qui en comparaison avec le marqueur de taille du poids moléculaire, sont situées au niveau qui correspond à un amplicon d'environ 701.

Après séquençage, des blast ont été réalisés dans la banque de données Genbank (Blast NCBI). Par les moyens d'analyse utilisés (Séquence ITS et recherche BLAST), les isolats du champignon étudié ont été identifiées comme étant *Ascochyta rabiei* (Annexe 20).

Les résultats de l'alignement des séquences de l'ITS de chaque souche montrent 99% d'homologie avec la séquence de *A.rabiei*. Ces résultats confirment ainsi l'identification moléculaire des isolats étudiés. À travers les résultats obtenus on peut dire que l'analyse de l'ITS fongique séquencé la région de l'ADNr a montré que tous isolats étudiées appartenaient à l'espèce *Ascochyta rabiei* (99.80% à 100 %) (Fig.63).

Par la suite nous avons procédé à la vérification et au repérage d'éventuelles erreurs commises lors du séquençage à l'aide du logiciel de bioinformatique « Molecular Evolutionary Genetics Analysis » (MEGA 5.0) qui permet de visualiser le chromatogramme qui représente les piques et les bases correspondantes qui constituent la séquence obtenue.

Après avoir effectué ces deux opérations, nous avons ensuite procédé à l'assemblage des deux (Séquences obtenues à l'aide des deux amorces ITS1 et ITS4) pour reconstituer l'ITS (consensus) pour chacune des souches (Fig.64).

Une recherche de similitude a été réalisé en utilisant les plateformes des bases de données du Gen Bank établies par le «Centre Américain pour les informations Biotechnologiques » (NCBI) : [http : // blast.ncbi.nlm.nih.gov/](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/).

Les résultats obtenus suite à cette recherche, montrent un taux de similitude compris entre 99.80% et 100% pour la base de données GenBank. En conséquence, ces résultats précités nous ont permis de déterminer et identifier le nom de l'espèce (Fig.65).

A travers les résultats de plateforme de bases de données nous a confirmé l'identité de nos 16 isolats étudiés appartiennent à l'espèce *Ascochyta rabiei* (Tab.37).

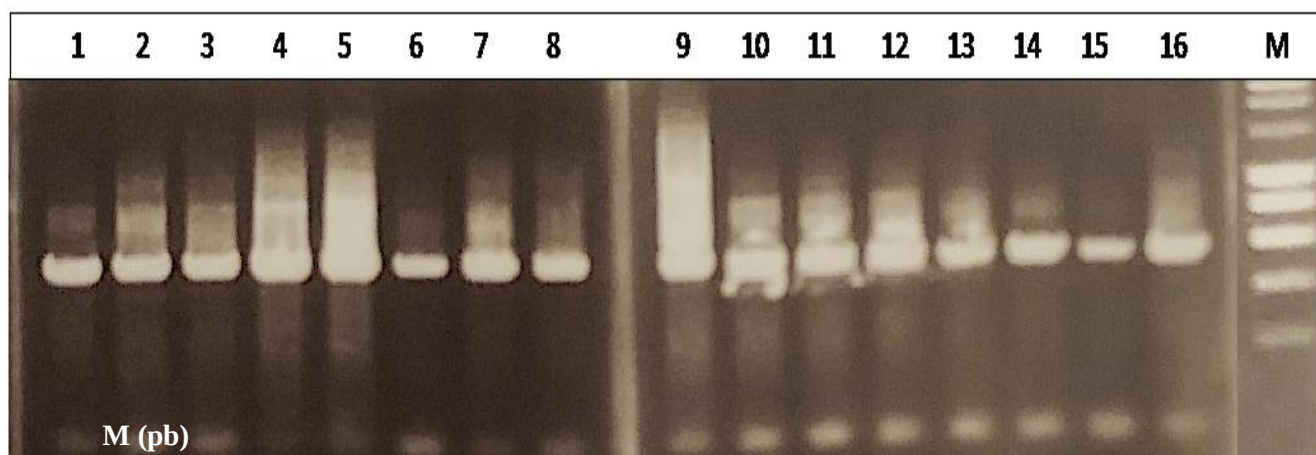
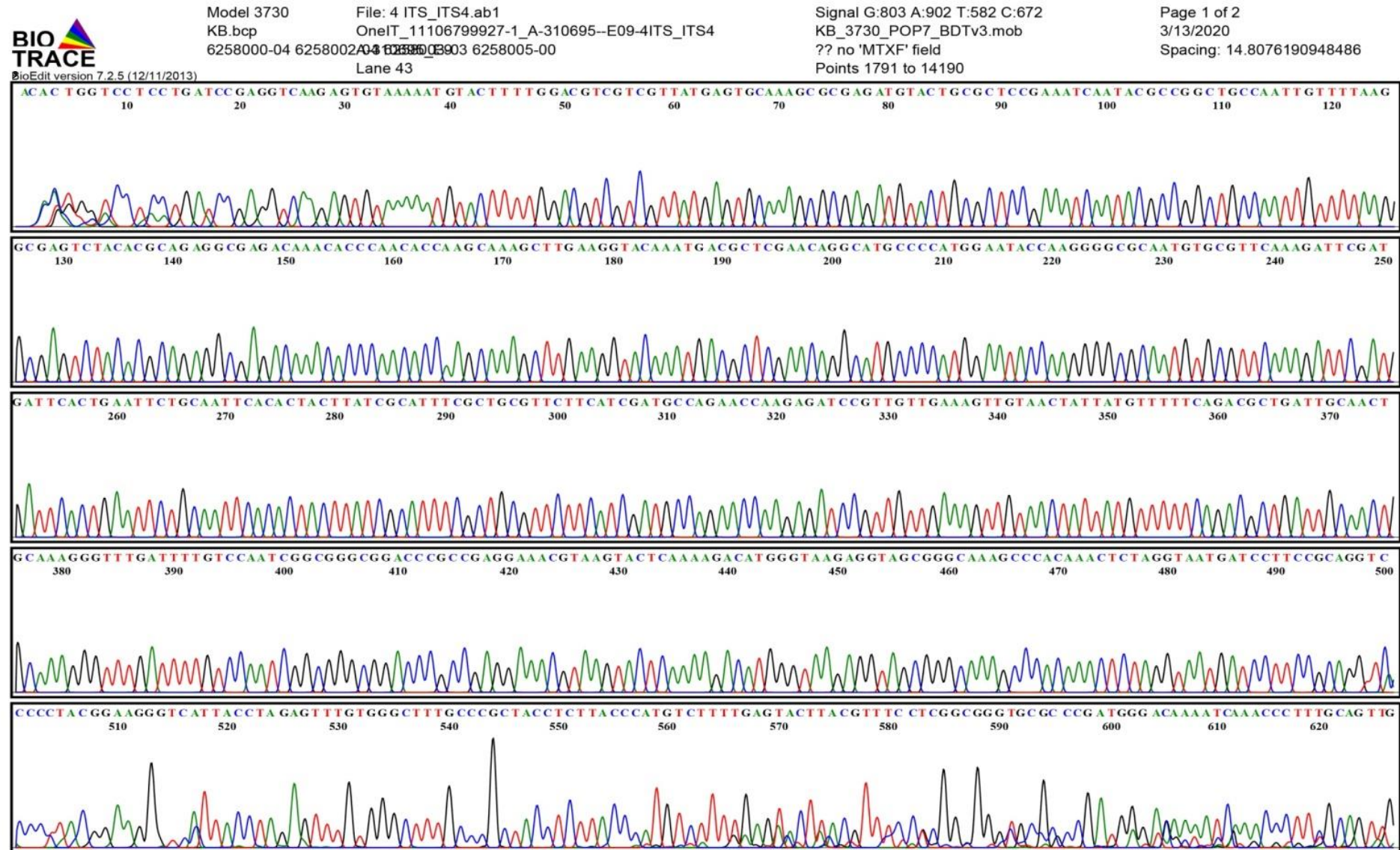


Figure 63: Profils électrophorétiques sur gel d'agarose dont l'amplification par PCR des régions ITS1 et ITS4 de l'ADN des différents isolats de *Ascochyta rabiei*. (M = marqueur moléculaire:1 kb).



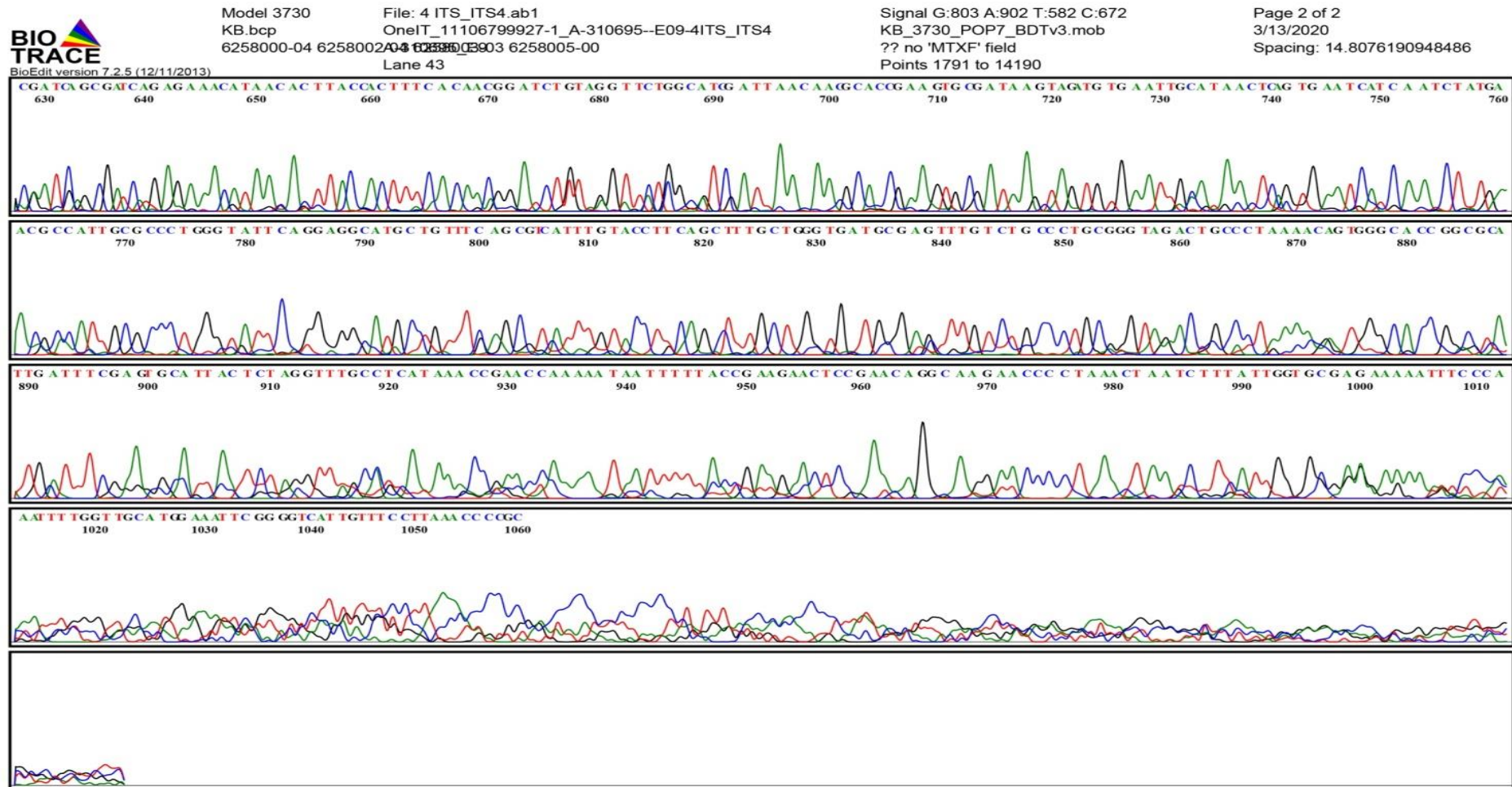


Figure 64 : La séquence ITS1 obtenue pour l'isolat MSC1

Tables 37: L'identité des isolats sur la base des séquences ITS.

Isolats	Lieu d'isolement	Identité	% Similarité avec la base de données GenBank (NCBI)
AT1	Ain Temouchent	<i>Ascochyta rabiei</i>	99.80 %
AT2	Ain Temouchent	<i>Ascochyta rabiei</i>	99.80 %
AT3	Ain Temouchent	<i>Ascochyta rabiei</i>	99.80 %
MOS1	Mostaganem	<i>Ascochyta rabiei</i>	100 %
MOS2	Mostaganem	<i>Ascochyta rabiei</i>	100 %
MOS3	Mostaganem	<i>Ascochyta rabiei</i>	100 %
MSC1	Mascara	<i>Ascochyta rabiei</i>	99.80 %
MSC2	Mascara	<i>Ascochyta rabiei</i>	99.80 %
MSC3	Mascara	<i>Ascochyta rabiei</i>	99.80 %
SB1	Sidi Bel Abbès	<i>Ascochyta rabiei</i>	99.80 %
SB2	Sidi Bel Abbès	<i>Ascochyta rabiei</i>	99.80 %
SB3	Sidi Bel Abbès	<i>Ascochyta rabiei</i>	99.80 %
SB4	Sidi Bel Abbès	<i>Ascochyta rabiei</i>	99.80 %
REL1	Relizane	<i>Ascochyta rabiei</i>	99.80 %
REL2	Relizane	<i>Ascochyta rabiei</i>	100 %
REL3	Relizane	<i>Ascochyta rabiei</i>	99.80 %

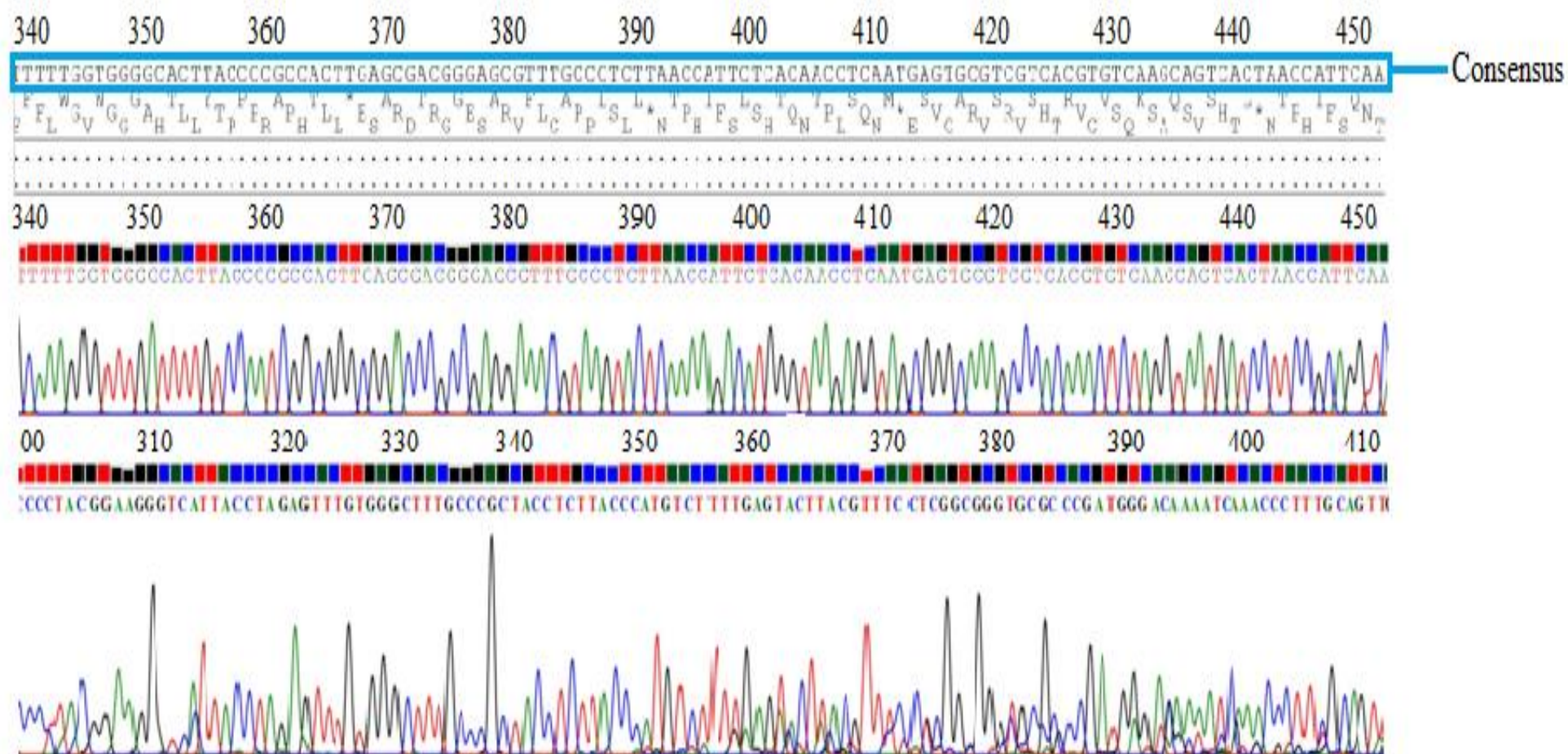


Figure 65 . L'assemblage de la séquence ITS1 et ITS4 obtenus pour l'isolat MSC1.

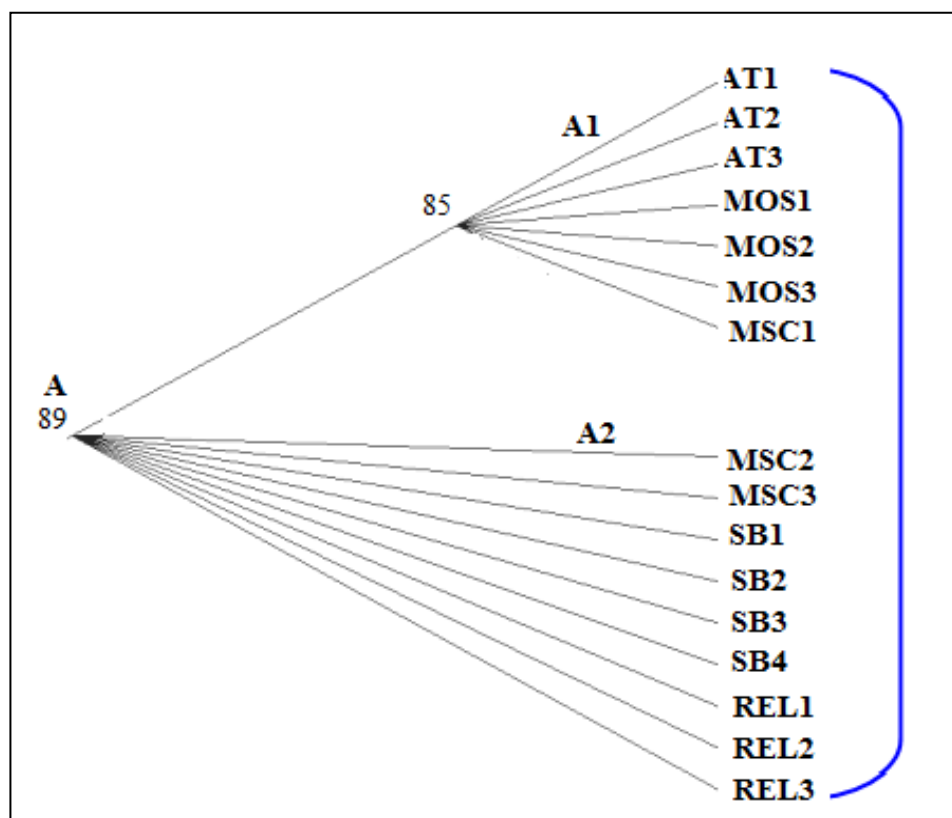


Figure 66. L'arbre phylogénétique montrant la relation entre les 16 souches isolées réalisé à partir de séquences de l'ITS par la méthode du Neighbor Joining (NJ). Les valeurs du bootstrap (1000 répétitions) supérieure à 80%.

4.6.3. Détermination des Mating types (MAT) présents dans l'ouest algérien

Les amorces spécifiques pour les mating types Mat1-1 et Mat1-2 ont été utilisés dans des expériences de PCR multiplex. Deux tailles différentes de produits amplifiés, 701pb pour MAT1-1 et 465 pb pour MAT1-2, ont été obtenus en PCR multiplex (Fig.67); parmi les 16 isolats, 56.25% produit un fragment spécifique pour MAT1-1, et 43.75% produit un fragment spécifique pour MAT1-2 (Tab.38).

Cette analyse révèle que les deux MATs ont été trouvés dans cinq régions dans l'ouest Algérien (Mascara, Ain Témouchent, Sidi Bel Abbès, Mostaganem et Relizane) pendant la campagne agricole 2015/2016. Ces résultats montrent que le génotype MAT1-1 semble plus courant que le génotype MAT1-2.

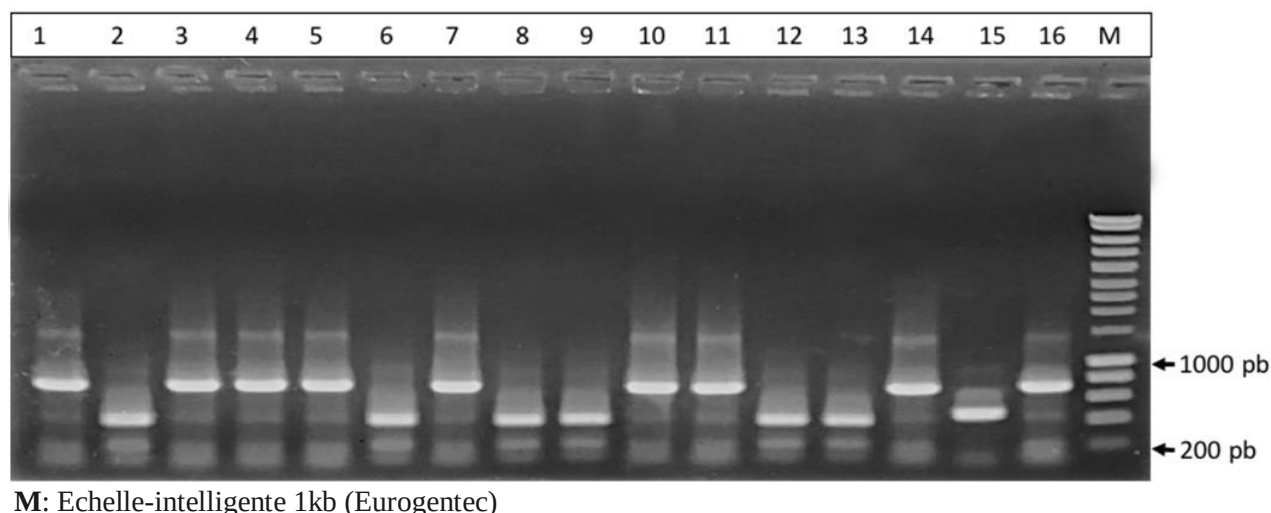


Figure 67. Amplification par PCR multiplex des idiomorphes de Mating types avec la combinaison de trois amorces utilisant 16 isolats de *Ascochyta rabiei* de la population d'Algérien. La voie M correspond aux marqueurs de taille d'ADN: 100 pb échelle d'ADN de masse moléculaire (Promega).

Tableau 38: Distribution des mating types de *A. rabiei* dans différentes régions dans l'ouest de l'Algérie.

N°	Régions	Isolats	Mating type (MAT1-1 ou MAT1-2)
1	Ain Témouchent	AT1	MAT1-1
2		AT2	MAT1-2
3		AT3	MAT1-1
4	Mostaganem	MOS1	MAT1-1
5		MOS2	MAT1-1
6		MOS3	MAT1-2
7	Mascara	MSC1	MAT1-1
8		MSC2	MAT1-2
9		MSC3	MAT1-2
10	Sidi Bel Abbès	SB1	MAT1-1
11		SB2	MAT1-1
12		SB3	MAT1-2
13		SB4	MAT1-2
14	Relizane	REL1	MAT1-1
15		REL2	MAT1-2
16		REL3	MAT1-1

Les résultats obtenus sur Mating types (MAT1-1 et MAT1-2) chez l'antracnose du pois chiche (*Ascochyta rabiei*) dans les cinq régions étudiées, ont montré que la reproduction sexuée ne se faisait pas à la même souche, soit entre MAT1 et MAT1 ou bien MAT2 et MAT2, la reproduction se produit entre différentes souches c'est-à-dire MAT1-1 et MAT1-2, Où est une grande variabilité génétique. Ces résultats donnent des informations sur les méthodes de traitement contre cette maladie. Dans le cas où MAT1 se trouve dans une région,

ce qui facilite la lutte et l'élimination de la maladie, alors où la variabilité génétique est déficiente. L'utilisation des produits comme traitement peuvent éliminer complètement la maladie de la même souche, en revanche, dans le cas de la présence et de la distribution des deux MATs (MAT1-1 MAT1-2) où il y a une grande variabilité génétique, il est difficile de traiter la maladie, donc la culture de pois chiche dans ces zones doit être évitée en raison des risques causés par cette maladie sur le pois chiche et la perte de rendement et donc l'inefficacité du traitement de produit testé. Cette mixage de Mating types diminue la résistance des variétés de pois chiche vis-à-vis à l'antracnose. La taille de l'échantillon pour les ratios MAT dans les populations de *D. rabiei* est critique (Vail et Banniza 2009). Dans notre étude, la taille des échantillons pour chacun des tests est de 4 isolats ou en dessous et peut ne pas être de taille suffisante pour permettre une détermination fiable des écarts par rapport au rapport 1: 1. Donc, le chi carré sur la collection totale des isolats de 16 isolats a également été utilisée pour fournir une image globale de la distribution MAT et fréquence. Les résultats de l'ensemble de la population algérienne ont montré un changement significatif vers une fréquence plus élevée de MAT1-1 sur MAT1-2 avec une valeur chi carré de 7,125 ($P < 0,001$) (Tab.39).

Tableau.39. Fréquences et rapports de Mating types des isolats de *Ascochyta rabiei* déterminés en utilisant une analyse PCR spécifique.

Régions	Nombre des isolats	MAT1-1 : MAT1-2	χ^2 ^a	P ^b
AinTémouchent	3	2 : 1	0.001	0.131
Mostaganem	3	2 : 1	1.121	0.111
Mascara	3	1 : 2	5**	< 0.01
Sidi Bel Abbès	4	2 : 2	1.133	1.562
Relizane	3	2 : 1	0.552	0.135
Total	16	9 : 7	7.125	< 0.01

^aChi-carré pour le test du rapport 1: 1 ; ^bProbabilité d'une plus grande valeur chi carré sous l'hypothèse nulle de Rapport 1: 1 (1 degré de liberté) ; ** Différences significatives (Chi carré) à 1%.

4.6.4. Discussion

L'investigation de terrain permet d'acquérir des connaissances sur l'état actuel de la prévalence et de la gravité de la maladie de la brûlure ascochytiq, ce qui constitue la base de l'établissement des priorités dans la gestion intégrée des maladies.

De telles connaissances sont actuellement absentes ou dépassées pour le pathosystème de l'*Ascochyta* en Algérie. Selon Andrabi et *al.* (2001), les facteurs climatiques tels que l'humidité et la température jouent un rôle important à la propagation de l'antracnose du pois chiche qui a des effets déterminants dans la transmission et l'évolution de la maladie, Les

semences infectées peuvent être un moyen de transport de l'agent pathogène d'une région à une autre (Sidique et Bultynck, 2004). Généralement les conditions climatiques dans les régions prospectées ont été caractérisées par une pluviométrie de moyenne varie entre 250 et 300 mm selon la région et des températures élevée à la moyenne de 19°C durant la campagne agricole 2015/2016. La sévérité de l'antracnose est plus importante dans deux régions (Mascara et Sidi Bel Abbès) où il y a des parcelles adjacentes irriguées, ce qui favorise les conditions de développement et l'évolution de la maladie. La date de semis optimale permet aux plantes de maximiser l'utilisation des ressources disponibles et être soumis à moins de contraintes (Sidique et Bultynck, 2004). La majorité des agriculteurs questionnés ont pratiqué le semis d'hiver. En effet, les régions de Relizane, Mostaganem et Ain Témouchent présentent le taux d'incidence et la sévérité les plus faibles comparativement aux autres régions prospectées (Mascara et Sidi Bel Abbès). La culture du pois chiche d'hiver se développe dans des conditions humides et il est exposé à la période de libération des ascospores de débris infectés de pois chiche (Gan et *al.*, 2006). La densité de semis peut avoir un impact sur la sévérité de la maladie car la densité élevée de plantation résulte une culture intense qui crée les conditions favorables du développement de la maladie (Sidique et Bultynck, 2004). Tandis que le pois chiche cultivé en rangs plus larges avait moins la maladie que lorsqu'il est cultivé en rangées étroites (Aken, 2001). Le stade végétatif de la plante et les résidus de culture peuvent affectent l'expression de la maladie des plantes cultivées (Gan et *al.*, 2006). Durant notre prospection, l'apparition de l'antracnose a été observée aux différents stades (ramification, floraison et pré-maturation) dans toutes les parcelles prospectées. Les résultats de certains chercheurs ont rapporté que cette culture devenait plus sensible à *A.rabiei* après la floraison et pré- maturation (Labdi et *al.*, 1998), Chongo et Gossen (2001) ont mentionné que le stade gousse était plus sensible que la stade plantule. Les résultats obtenus sur l'investigation nous a permis de dire que la culture de pois chiche est sensible à l'antracnose de part, l'incidence et l'évolution de la maladie varie en fonction des facteurs liées à la culture du pois chiche (variété et l'origine), la source de contamination (l'inoculum), la sévérité du pathogène et les conditions climatiques (l'humidité et la température) d'autre part. Bien que l'infection ait commencé dans de nombreux champs dans certaines provinces, la poursuite du développement de la maladie a été arrêtée en raison des conditions de sécheresse qui ont été rencontrées en particulier pendant la campagne 2015/2016. Dans les régions de Maoussa et Teghennif (Mascara), une incidence et une sévérité élevées de la maladie ont été observées, ce qui a coïncidé avec la présence de deux MATs, probablement en raison de conditions de température fraîche et d'humidité

relativement élevée qui sont propices au le développement de la maladie (Pande et *al.*, 2005) et favorables au développement du stade sexuel (Rhaïem et *al.*, 2008). La coexistence des deux MATs dans cet endroit a pu contribuer à l'évolution rapide de la virulence de l'agent pathogène virulence et aux graves épidémies d'*Ascochyta* observées dans la région (Rhaïem et *al.*, 2008). Au cours de la campagne 2015/2016, les conditions étaient plus favorables au développement de la maladie, et des infections ont été observées à la fois sur des variétés de pois chiche cultivées. Dans cette étude, les deux MATs ont été trouvées dans les cinq régions dans l'ouest algérien. Les isolats étudiés étaient des MAT1-1 et MAT1-2 dans la plupart des régions prospectées. L'analyse MAT des collections ont montré que les deux MATs existaient déjà en Algérie (Mahiout, 2017). Par conséquent, la reproduction sexuée pourrait avoir joué un rôle important dans l'évolution des pathogènes et dans le développement de pathotypes hautement virulents dans les populations algériennes de *D. rabiei* où la plupart des matériel de reproduction sont sensibles au pathotype III. Des pathotypes hautement virulents de *A. rabiei* ont été identifiés en Algérie (Mahiout, 2017) et en Syrie (Udupa et *al.* 1998). Plus récemment, le pathotype le plus virulent (pathotype IV) a été enregistré en Syrie en 2004 par Bayaa et *al.* (2004). La présence du téléomorphe (*Dydimella rabiei*) dans le cycle de *A. rabiei* contribue à la variabilité des populations du pathogène, ce qui peut générer de nouvelles combinaisons de gènes de virulence et ainsi créer de nouveaux pathotypes (Pande et *al.*, 2005). L'analyse globale de l'ensemble de la collection des isolats de cette étude a révélé une distribution très asymétrique des MATs. Cela indique que la MAT1-1 peut avoir un avantage compétitif par rapport à la MAT1-2 et que la population algérienne de *A. rabiei* ne s'accouple pas au hasard. Cette fréquence inégale dans les MATs indique également qu'il peut y avoir eu moins de recombinaison sexuelle dans la population algérienne. Des fréquences inégales de MATs ont été signalées ailleurs (Vail et Banniza, 2009). Des isolats de l'Inde et du Pakistan ont été signalés comme étant exclusivement MAT1-1, et les isolats de Grèce, d'Italie et du Maroc étaient tous MAT1-2 (Navas-Corte's et *al.*, 1998). Les deux MATs de *D. rabiei* ont été signalés dans les principaux pays producteurs de pois chiches du monde (Kaiser 1997 ; Armstrong et *al.*, 2001 ; Rhaïem et *al.* 2008 ; Vail et Banniza, 2009). La présence d'une MAT a été signalée en Grèce, en Italie, en Australie et au Maroc (Navas-Corte' s et *al.*, 1998 ; Phan et *al.*, 2003), ce qui suggère une sélection positive pour une MAT par rapport l'autre. MAT1-1 était la seule MAT commune et prévalent dans les sous-populations côtières en syrie, et cela était probablement dû au fait que la MAT1-1 avait un avantage concurrentiel sur la MAT1-2 (Zhan et *al.*, 2007). L'absence d'accouplement aléatoire et la recombinaison sexuelle limitée dans ces populations peut avoir eu un impact sur la diversité génétique des populations de

pathogènes (Vail et Banniza, 2009). Les fréquences des isolats MAT1-1 et MAT1-2 dans certaines régions étaient proches d'un rapport 1:1, ce qui indique que l'accouplement aléatoire peut se produire dans des conditions naturelles et produire des ascospores qui peuvent servir à des fins de recherche comme inoculum primaire pour initier des épidémies de maladie. Des résultats similaires ont été signalés aux Etats-Unis et en Espagne (Navas-Corte' s et *al.*, 1998 ; Barve et *al.*, 2003 ; Peever et *al.*, 2004). De même, l'analyse MAT de la population de pathogènes provenant de différents champs et années dans le pacifique Nord-Ouest des Etats-Unis a montré que 16 isolats collectés en 1983 étaient exclusivement MAT1-1, tandis que les autres populations de terrain de 1998 à 2000 présentaient toutes des proportions approximativement égales de chaque MAT (Peever et *al.*, 2004). La taille d'échantillonnage pour les analyses du rapport MAT dans les populations de *A. rabiei* est critique (Vail et Banniza, 2009). La distribution des deux MATs en Algérie devrait augmenter la possibilité de reproduction sexuée et de recombinaison génétique et la libération d'ascospores qui peuvent propager la maladie. L'augmentation de la variabilité génétique dans la population de pathogènes peut contribuer au développement résistance aux fongicides (Kaiser, 1997). Les programmes d'amélioration génétique de sélection peuvent avoir à faire face à des niveaux élevés de variabilité génétique de l'agent pathogène, qui pourrait contribuer à la dégradation de la résistance des cultivars existants (Armstrong et *al.*, 2001). Des efforts supplémentaires sont nécessaires pour identifier de nouvelles sources de résistance. La connaissance de la variation génétique des populations de pathogènes est nécessaire pour réussir la sélection de la résistance (Peever et *al.*, 2004). Cependant, des observations récentes indiquent que l'apparition de la maladie devient variable au fil des saisons en raison des changements favorisent le développement de la maladie et l'infection sévère des gousses au printemps (Abang et Malhotra, 2008). Considérant que même les variétés de pois chiche résistantes sont sensibles à la brûlure ascochytiq ue pendant la phase de reproduction, un effort concerté est nécessaire pour assurer le développement de variétés de pois chiche résistantes à tous les stades de développement de la culture (Abang et Malhotra, 2008). Le contrôle de la brûlure ascochytiq ue dépend principalement sur l'utilisation de cultivars résistants en raison du coût élevé des applications de fongicides et leurs effets sur l'environnement de nombreux pays. Identification de nouvelles sources de résistants nécessite une connaissance de la variation génétique du pathogène. Cette étude révèle les niveaux de variation génétique parmi 16 isolats de *A. rabiei* étudiées de cinq différentes régions dans l'ouest Algérien. Les isolats du champignon ont été identifiés comme *A. rabiei* par les moyens d'analyse des séquences des régions ITS. La forme *Didymella rabiei* est présente dans l'ouest algérien et les Mating type

1-1 et 1-2 sont identifiés. Le MAT1-1 est plus commun. Nos résultats sont en accord avec l'étude effectuée par Nourollahi et *al.* (2011) dans la province ouest iranienne où la majorité des isolats appartiennent à MAT1-1 (64,08%) contre 35,92 % pour MAT1-2. Les types MAT1-1 et MAT1-2 sont signalés dans plusieurs régions de culture de pois chiche dans le monde (Armstrong et *al.*, 2001 ; Atik et *al.*, 2011) alors que dans d'autres pays seul le MAT-1 a été signalé. L'apparition des Mating types 1-1 et 1-2 dans le nord-ouest de l'Algérie et notamment dans la région de Mascara et de Mostaganem où le pathotype III est détecté, pourrait favoriser la propagation de descendance hautement agressive (Mahiout, 2017). Par ailleurs le test de PCR spécifique MAT est utilisé dans la détermination rapide du type sexué chez les populations de *A. rabiei* et la détection de l'introduction d'un second Mating type dans une région donnée (Peever et *al.*, 2004; Bayraktar et *al.*, 2007). L'étude de la distribution des deux Mating types devrait à l'avenir concerner toutes les zones de culture de pois chiche en Algérie car on sait que les ascospores du téléomorphe représentent une descendance recombinante qui pourrait contribuer à une augmentation de la diversité génotypique dans les populations de *A. rabiei*. Cette variation est potentiellement adaptative, ce qui permet à l'agent pathogène d'évoluer en virulence accrue sur les cultivars résistants et / ou de développer une résistance aux fongicides (Sharma et Ghosh., 2016). En outre, les gènes MAT ont été proposés comme régions du génome potentiellement utiles pour la reconstruction phylogénétique et les études de variabilité génétique. La coexistence de la reproduction sexuée et de la reproduction asexuée a été démontrée comme jouant un rôle important dans l'épidémiologie et la biologie des populations de *A. rabiei*. Le téléomorphe de *A. rabiei* peut avoir un effet considérable sur la propagation, la survie et la lutte contre la brûlure ascochytiq (Armstrong et *al.*, 2001). Bien que les résultats pour MAT suggèrent une légère sélection positive dans certaines zones pour la survie d'une MAT plutôt que d'une autre, des d'autres preuves sont nécessaires pour étayer cette conclusion.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Ascochyta rabiei agent de l'anthracnose, est l'une des plus graves maladies affectant la culture de pois chiche causant des dégâts considérable dans la récolte en quantité et qualité. Dans ce contexte, la présente investigation a été menée dans l'objectif d'étudier la variabilité phénotypique du champignon, évaluation de l'effet inhibiteur *in vivo* et *in vitro* de deux fongicides systémiques, évaluation du taux de l'incidence de la maladie, la mise en évidence de la variabilité pathogénétique, les aspects physiopathologiques et la caractérisation moléculaire par l'ITS et le Mating type des différents isolats de *A.rabiei* isolées de différentes zones de l'ouest Algérien .

Plusieurs prospections ont été effectuées dans des parcelles de pois chiche à travers cinq wilayas de l'ouest Algérien (Mascara, Ain Temouchent, Sidi Bel Abbès, Mostaganem et Relizane) dont l'objectif est le dépistage de *A.rabiei* agent de l'anthracnose. Ces régions se caractérisent par différentes conditions climatiques ce qui a permis d'isoler différents isolats du champignon.

Il a été constaté que l'infestation du champ de pois chiche par l'anthracnose est de plus en plus importante et rapide lorsque les conditions climatiques (Température, humidité) sont favorables et l'apparition de la maladie est précoce. Le début des attaques du *A.rabiei* ont été observées aux stades floraison et ramification

L'étude de l'incidence de la maladie a fait ressortir une incidence moyenne de 28.79%. La région de Mascara présente le taux le plus élevé avec 46.68%, suivi de Sidi Bel Abbès avec 38.5%, la région de Relizane avec un taux de 26.5% et en fin Mostaganem et Ain Temouchent avec un taux de 18.67% et 13.63 respectivement. Concernant la sévérité de la maladie d'après l'échelle de Reddy et Singh (1984) varie d'une parcelle à une autre, entre 1.5 et 4.9. Ainsi, les parcelles de Mendes, Yellel, Beni dergane (Relizane), Sidi Ali, Achacha, Sidi Lakhdar (Mostaganem), Hassi El Ghalla Kihal, Beni Saf (Ain Temouchent), Tassala, Sidi Lahcene, Attouche et INRASBA (Sidi Bel Abbès) sont résistantes à la maladie, les parcelles de Maoussa, Teghennif et Sidi Kada sont modérément sensibles.

L'étude de la biologie du pathogène, les isolats a révélé des différences morphologiques au niveau macroscopiques (couleur et aspect des colonies, abondance des pycnides, couleur des cirrhes, l'aspect du mycélium et croissance mycélienne) et

microscopique (forme, taille des pycnidiospores, couleur des pycnides et nombre des spores monocellulaire et bicellulaire). La variabilité est nettement observée pour les aspects vitesse de croissance mycélienne et sporulation. C'est ce qui nous a amené à émettre l'hypothèse de la présence d'une différence entre les isolats étudiés. La présence de cette variabilité nous a permis de caractériser et de classer les différents isolats.

L'étude de la variabilité pathogénique a été réalisée à partir de l'interaction des isolats de *A.rabiei* avec les lignées locales et différentielles de pois chiche (*Cicer arietinum* L.), l'existence d'une variabilité entre les isolats étudiés a été mise en évidence. Nous avons constaté que les isolats n'attaquent pas les lignées avec le même niveau d'agressivité et de virulence. Ces résultats nous ont permis de classer ces isolats en trois (03) niveaux d'agressivité différents: isolats hautement agressifs, isolats moyennement agressifs et isolats non agressifs.

Une variabilité importante dans la réaction des lignées a été observée vis à vis aux différents isolats du champignon d'où la présence d'une variabilité en ces lignées. Ces derniers sont classés en trois catégories: sensibles, tolérantes et d'autres lignées expriment une certaine résistance. La lignée tolérante ILC482, devient cependant sensible à certains isolats. Les résultats obtenus sur les deux lignées (ILC 263 et ILC 1929) confirment leur sensibilité à un grand nombre d'isolats. Les mêmes résultats ont été rapportés par Iqbal et al, (2004).

La comparaison entre les isolats étudiés a révélé une variabilité pathogénique. L'agressivité des isolats a été démontrée ainsi que l'existence et la distribution de trois pathotypes (Pathotype I, II et III). Le pathotype III est hautement agressif et le plus dominant dans toutes les régions prospectées (Mascara, Sidi Bel Abbès, Mostaganem et Relizane) à l'exception de la région d'Ain Temouchent.

L'étude physiopathologique des isolats de *A. rabiei* a permis de dégager quelques données qui permettent d'élargir les connaissances sur ce champignon. Une variabilité physiologique a été observée lors de cette étude.

La croissance mycélienne des isolats de *A.rabiei* testés en fonction des différents facteurs étudiés, nous a permis de constater des différences très significatives dans le comportement du pathogène. Il en ressort de l'étude physiologique que le milieu le plus favorable pour *A. rabiei* est le milieu CSMDA. La température optimale au alentour de 25°C et un pH 5.5 sont plus favorable au développement du champignon.

Il a été démontré dans ce présent travail qu'une photopériode de 12 h apparaît adéquate pour *A.rabiei* que l'incubation sous lumière continue et sous l'obscurité continue.

L'effet de la lumière sur le développement du champignon, de même l'induction de *A. rabiei* dépend de l'intensité et de la quantité de lumière. L'étude des exigences n'a pas été réalisé seulement pour répondre à des interrogations d'ordre fondamental, mais plutôt parce qu'elle pourrait être utile pour le choix des mesures de contrôle de la maladie.

Actuellement, en Algérie différentes matières actives sont utilisées dans les programmes de lutte chimique contre *A. rabiei*. Dans ce contexte et à travers les résultats des tests de l'effet de deux fongicides sur ce pathogène, il s'avère que l'effet du benomyl varie, selon les isolats de *A. rabiei* testés. Par conséquent, avec le carbendazime nous avons enregistré une inhibition significative de la croissance mycélienne à une concentration de 0.5 g/l pour tous les isolats.

D'autres part nous avons pu mettre en évidence l'efficacité de ces fongicides dans la réduction de manière significative la croissance mycélienne du champignon (*in vitro*) et la réduction de l'incidence de la maladie (*in vivo*). Cette réduction est très importante dans le cas des variétés potentielles et d'un grand intérêt agronomique (fertilité du sol), nutritionnelle (valeur alimentaire et teneur en protéines) et économique (production et rendement).

À la lumière des résultats obtenus avec les traitements chimiques contre l'anthracnose, on peut conclure que les produits systémiques utilisés à certaines concentrations sont des fongicides de la famille benzimidazole (benomyl et carbendazime) sont inclus dans le cadre de la stratégie de lutte contre cette maladie cryptogamique.

L'analyse moléculaire, nous a permis de conclure que l'analyse de l'ITS fongique séquencé la région de l'ADNr a montré que tous isolats étudiés appartenaient à l'espèce *A. rabiei* (100%). L'analyse des mating types révèle que les deux MATs (MAT1-1 et MAT1-2) ont été trouvés et distribués dans cinq régions dans l'ouest algérien (Mascara, Ain Temouchent, Sidi Bel Abbès, Mostaganem et Relizane) pendant la campagne agricole 2015/2016. Ces résultats montrent que le MAT1-1 semble plus courant que le MAT1-2.

Au terme de notre étude, les résultats obtenus apporteront sûrement une contribution à la connaissance des différents isolats de *A. rabiei* et ouvriront des perspectives intéressantes pour des études sur d'autres aspects tels que la détection et l'épidémiologie de l'anthracnose du pois chiche.

Concernant la variabilité morphologique, culturale et physiologique, nous pensons que cette étude est nécessaire pour une approche en vue d'une caractérisation moléculaire; condition importante pour l'obtention de résultats plus précis. Les résultats que nous avons exposé sur le comportement de *A. rabiei* vis-à-vis des facteurs étudiés restent insuffisants

pour une caractérisation précise des isolats du champignon.

Une caractérisation moléculaire future doit toucher une large gamme d'isolats de *A. rabiei* en vue de tracer une carte de distribution des mating type.

L'antracnose causée par *A. rabiei* est la maladie la plus importante du pois chiche causant une réduction considérable de la production et constitue une vraie menace pour les nouvelles variétés de pois chiche introduite. Dans ce contexte et afin de mieux connaître cette pathogénie, D'autres investigations doivent d'être menées telles que:

- ❖ Elargir les zones d'études et de prospections afin d'établir une carte géographique de distribution des foyers de cette maladie en Algérie.
- ❖ Etude de virulence de nos isolats pour pouvoir recenser les races physiologiques existantes en Algérie.
- ❖ Réaliser d'autres analyses moléculaires par d'autres techniques telles que les SSR, RAPD...etc. Pour mieux caractériser le pathogène en vue d'une bonne maîtrise de son contrôle d'un côté et mettre au point une stratégie de lutte intégrée de l'antracnose du pois chiche.

PATHOGENIC DIVERSITY IN *Ascochyta rabiei* IN CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.) IN THE WESTERN OF ALGERIA

Bettouati Abdelkader^{1,2,*}, Meziane Malika², Setti Benali², Hamdi Samia³

¹Faculty of Agronomic Science and Biotechnology, University Hassiba Ben Bouali of Chlef, 02000, Algeria

²Laboratory of Production and Plant Protection, University Hassiba Ben Bouali of Chlef, 02000, Algeria

³INRAA / URO, National Institute of Agricultural Research Algerian, Sidi Bel Abbès, Algeria

ABSTRACT

Ascochyta rabiei is a fungus agent responsible for the anthracnose of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) causing serious disease in Algeria and all over the world. Ten isolates of *A. rabiei* were harvested in five regions in western Algeria. Isolates used in this study are characterised pathogenically after their inoculations on thirteen chickpea lines including seven introduced lines, and six local lines. The artificial inoculations were carried out by spraying an inoculum (5.10^5 spores/ml) on fifteen (15) days aged seedlings. The results obtained show the existence of a pathogenic variability of this agent. Regarding the evaluation of the aggressiveness of the studied isolates, it seems that the isolate MSC2 is particularly aggressive with respect to all inoculated lines, followed by SB2 and REL1, five isolates are moderately aggressive (MSC1, SB1, SB3, MOS2 and REL2), two are non-aggressive isolates (AT1 and MOS1). The aggressivity study revealed three levels of aggressiveness: highly aggressive isolates, moderately aggressive isolates and non-aggressive isolates. For the evaluation of the reaction of tested chickpea lines, the results obtained allowed us to classify the tested lines in three categories. Through this study, we believe that pathogenic variability is necessary for an approach to molecular characterisation.

KEYWORDS:

Ascochyta rabiei, *Cicer arietinum* L., Pathogenicity, Aggressivity, Algeria

INTRODUCTION

Food legumes in Algeria have always been third in terms of the area, after cereals and fodder. Their area is of the order of 90 thousand hectares representing 0.21% of the total agricultural area in 2014. The most cultivated species are in order: beans, chickpeas, dry peas, lentils and dried beans [1-2].

Chickpea (*Cicer arietinum* L.), one of the most important grain legumes in Algeria, ranks second after bean fever. Most of the cultivated area of this spe-

cies is concentrated in the west of the country, particularly in Tlemcen and Ain-Temouchent regions [1].

In Algeria, despite the sharp increase in the area planted to chickpea, yields remained very low. They hardly exceed eight quintals per hectare. This low production is due to an overall rainfall deficit, and unevenly distributed over time and space. In addition to this, poor soil cultivation, a proliferation of weeds, poor seed conditions and phytosanitary problems are added. It is above all the susceptibility to diseases where anthracnose, foliar disease caused by a fungus *Ascochyta rabiei* (Pass.) Which remains the most formidable disease [3]. One of the greatest biotic stresses reducing potential yields in chickpea is ascochyta blight caused by *Ascochyta rabiei* Pass. (Labr.) (Teleomorph, *Didymella rabiei* v. Arx. syn. *Mycosphaerella rabiei* Kovachevski) [4]. The use of resistant chickpea cultivars is the most effective and economical management strategy for ascochyta blight [5-6]. The concentration of the inoculum is one of the important factors influencing the severity and epidemiology of plant diseases. [7]. Studies conducted in Algeria on the pathogenicity of the parasite show a great variability on these traits [1-7-8]. Our research work addresses the problem of a fungal disease in Algeria that is chickpea anthracnose. Our goal is to study pathogenic variability. Isolates of *Ascochyta rabiei* against a range of different chickpea lines.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. Origin of lines. During the 2015-2016 crop year, ten (10) plots were prospected in five regions in western Algeria that was favourable for growing chickpeas (Mascara, Sidi Bel-Abbes, Ain Temouchent, Mostaganem and Relizane) (Figure 1).

The plant material consists of a set of lines used by many researchers working on chickpea anthracnose in the study of the pathogenicity of *A. rabiei* isolates. We used thirteen (13) varieties provided by INRAA / URO of Sidi Bel Abbes. Six (06) are local and seven (07) introduced (Table 1).

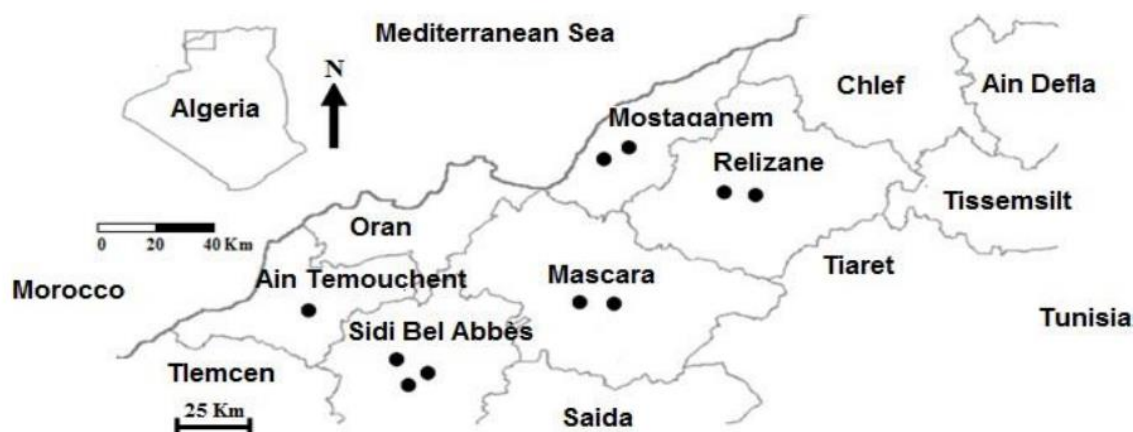


FIGURE 1
Map of five surveyed regions and collecting samples of chickpeas

TABLE 1
Differential chickpea lines and their origin

Chickpea Lines	Type	Origin
ILC 482	Kabuli	ICARDA*
F 97-657	Kabuli	ICARDA
ILC 3279	Kabuli	ICARDA
ILC 263	Kabuli	ICARDA
F 03-19C	Kabuli	ICARDA
Flip 05-69C	Kabuli	ICARDA
INRA 199	Desi	INRA**
F 10-25	Kabuli	Local
F 10-5/11	Kabuli	Local
Col 08	Kabuli	Local
GP 10	Kabuli	Local
Col 25/24	Kabuli	Local
F482	Kabuli	Local

* International Centre for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria.

** INRA: National Institute of Agronomic Research, Versailles, France.

Fungal material. Isolates of *Ascochyta rabiei*.

The isolates of *Ascochyta rabiei* used in this study were obtained by isolation from stalk samples, stems and chickpea pods with symptoms of anthracnose. Ten (10) isolates were used in this test (Table 2).

Conservation of isolates. The isolates were conserved in Petri dishes contained CSMDA medium (Chickpea Seed Meal Dextrose Agar) [10]. The isolates were maintained on CSMDA medium at 20±2°C [11].

Inoculum preparation. The seeds of the lines used are immersed in a solution containing 2% sodium hypochlorite for 3 minutes. They are rinsed 3 times with distilled water of one seed per pot (10 x 6 cm) containing a substrate of peat (1/1,

v / v). The sand is previously disinfected by the Bergerac method. The plants are carefully watered, 1 day on 2, with tap water.

Inoculation of plants. A spore suspension of ten isolate was prepared from 15-day-old cultures as described above. The suspension was filtered through two layers of muslin cloth and spore concentration was determined with a haematocytometer and adjusted to 5.10⁵ spores/ ml with sterile distilled water. Tween 80 was added to the spore suspension as a surfactant agent for sticking the spore to leaves of chickpea plants. Inoculation was done on 15-day-old plants. The pots are first put in closed plastic containers. After that, they are transferred to a greenhouse and sprayed daily with sterile distilled water until the appearance of symptoms.

TABLE 2
Geographical origin and designation of *A. rabiei* isolates in western Algeria

Isolates	Geographical origins	Sites	Dates of isolation	Isolation organs
MSC1	Mascara	Maoussa	November 2015	Pod
MSC2	Mascara	Tighennif	December 2015	Pod
AT1	Ain Temouchent	Hassi El Ghalla	November 2016	Pod
SB1	Sidi Bel Abbes	Tassala	September 2015	Stem
SB2	Sidi Bel Abbes	Sidi Lahsen	October 2015	Stem
SB3	Sidi Bel Abbes	Attouche	October 2015	Pod
MOS1	Mostaganem	Sidi Ali	September 2016	Pod
MOS2	Mostaganem	Sidi Lakhdar	September 2016	Stem
REL1	Relizane	Mendes	October 2016	Stem
REL2	Relizane	Yellel	October 2016	Stem

Rating scale. The severity of the disease is noted from 1 to 9, according to the scale of [12]. Which is based on the intensity of the symptoms, 21 days after inoculation presents itself as follows:

- 1 = No infection;
- 2 = Highly resistant (lesions on 1–5% of the plant);
- 3 = Resistant (lesions on 6–10%);
- 4 = Moderately resistant (lesions on 11–15%);
- 5 = Intermediate (lesions on 16–40%);
- 6 = Moderately susceptible (lesions on 41–50%);
- 7 = Susceptible (lesions on 51–75%);
- 8 = Highly susceptible (lesions on 76–100%);
- 9 = Highly susceptible, plant killed.

The chickpea lines rated 1.0 to 4.9 were considered resistant and those rated 5.0 to 9.0 were considered susceptible [13]. The classification of *Ascochyta rabiei* isolates is based on degree intervals of aggressiveness [10];

- A. 1 - 3.9 : Non aggressive isolate;
- B. 4 - 5.9 : Moderately aggressive isolate;
- C. 6 - 9 : Highly aggressive isolate;

The intervals below were used to know the susceptible, tolerant and resistant varieties [10];

- 1- Resistant variety (R) : 1-3.9 ;
- 2- Tolerant variety (T) : 4-5.9 ;
- 3- Sensitive variety (S) : 6-7.9 ;
- 4- Variety very sensitive (VS) : 8-9 ;

The degree of attack is evaluated by an average attack index: (Eq. 1)

This coefficient makes it possible to assess the attack quantitatively and to express the level of sensitivity or resistance of the plant.

Statistical analysis. The variances (σ^2), averages and standard deviation (SD) of various repetitions were calculated and analysed by the software of statistics (STAT BOX 6.0.4. GRIMMERSOFT) and the device used are the unifactorial total randomisation (one studied factor) by the Newman and Keuls test ($P_{0.05}$ and $P_{0.01}$).

RESULTS AND DISCUSSION

Study of the pathogenicity of *Ascochyta rabiei*. Inoculation on a susceptible chickpea lines ILC 263. The inoculation of the ILC 263 line with the ten (10) isolates, made it possible to reproduce the typical symptoms of the anthracnose of the chickpea. The re-isolation of the pathogen from the diseased seedlings was made easily, who verified the postulate of Koch; we therefore confirm the presence of *Ascochyta rabiei*. Results are shown in Figure 2.

The results obtained on line ILC263 confirm their sensitivity to a large number of isolates. These results were indicated by some authors [14, 8].

After an incubation period of 5 to 6 days with a mean of 5.3, the latency period is between 8 and 9 days with a means of 8.6 days. This difference indicates that the time required for the appearance of the first pycnidia varies from one isolate to another (Table 3).

We also observed that the incubation period varies between 5 and 6 days depending on the isolates, while the latency period lasts from 8 to 9 days. In a similar study of the virulence of six (06) Algerian isolates tested on six (6) differential lineages, [15] found that the incubation period varied between 8 and 9 days, whereas the latency varied between 10 and 13 days. The incubation period variation and the latency period were also indicated (8 to 10) by [9].

In Figure 3 and Figure 4, we note that there are three (03) highly aggressive isolates (REL1, SB2 and MSC2) with categories of severity ranging from 6, 7.5 and 8 respectively. Five (05) isolates are moderately aggressive with categories of severity ranging between 4 to 5.9 (MSC1, SB1, SB3, MOS2 and REL2) and two (02) nonaggressive isolates, with severity levels ranging from 1 to 3.9 (AT1 and MOS1).

$$AI = \frac{1F1 + 2F2 + 3F3 + 4F4 + 5F5 + 6F6 + 7F7 + 8F8 + 9F9}{N} \quad (\text{Eq. 1}) [10].$$

AI: Attack index

F: Number of affected plants for each grade in the rating scales (1-9)

N: Total number of inoculated plants.

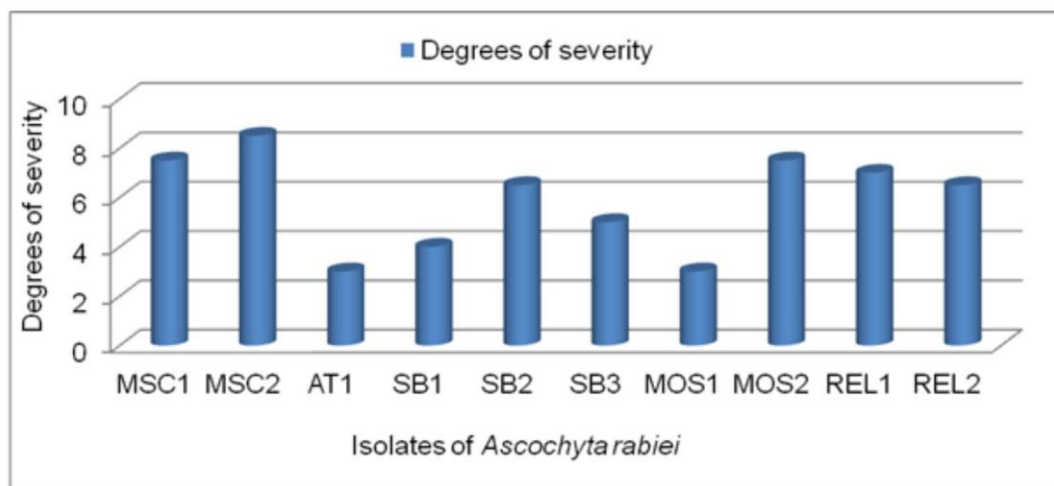


FIGURE 2
Severity of the disease on the sensitive line ILC 263

TABLE 3
Incubation and latency periods (in days) of *A. rabiei* isolates.

Isolates	Incubation periods (days)	Latency periods (days)
MSC1	5 ± 0.81	8 ± 0.81
MSC2	5 ± 0.81	9 ± 0.81
AT1	6 ± 0.81	9 ± 0.81
SB1	5 ± 0.81	9 ± 0.81
SB2	5 ± 0.81	8 ± 0.81
SB2	6 ± 0.81	9 ± 0.81
MOS1	5 ± 0.81	9 ± 1.15
MOS2	6 ± 0.81	9 ± 0.81
REL1	5 ± 0.81	8 ± 1.15
REL2	5 ± 0.81	8 ± 0.81
Mean	5.3	8.6

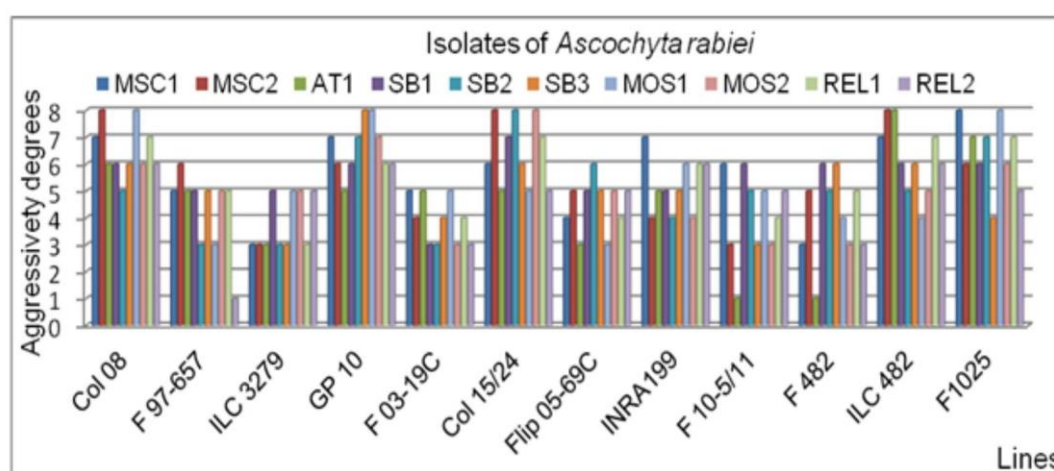


FIGURE 3
Aggressivity of *Ascochyta rabiei* isolates on all lines tested

Significant differences in the degree of severity were found in the isolate, concerning the evaluation of the degree of aggressiveness of our isolates, the results obtained allowed us to note that the isolates (MSC2, SB2 and REL1) are highly aggressive. The isolates (MSC1, SB1, SB3, MOS2 and REL2) are moderately aggressive and the isolates (AT1 and MOS1) are non-aggressive. These results allow us to classify these isolates into three (3) levels of aggres-

siveness: highly aggressive isolates, moderately aggressive isolates and non-aggressive isolates. This variability in aggression was also indicated by [16, 17 - 18]. [19 - 15] [20 - 8 , 21]. This variability in aggression was also indicated in Indian by [22]. The same study of pathogenic variation of different chickpea lines was obtained in Turkey by [23]. Through the results obtained, we find that the aggressiveness of *A. rabiei* is variable, with highly significant differences between the isolates (Table 4).

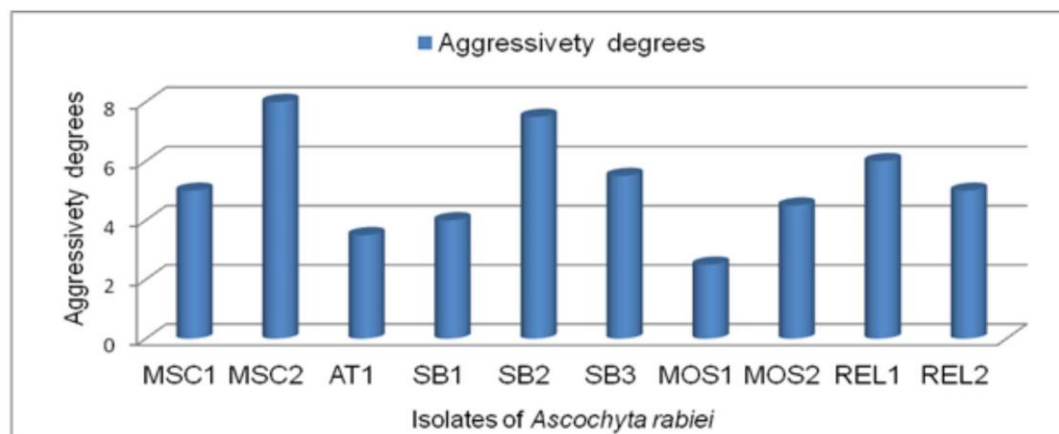


FIGURE 4
Average of Aggressivity of *Ascochyta rabiei* isolates

TABLE 4
Aggressiveness of the isolates of *A. rabiei* on 12 chickpea lines

Iso- lates	MSC1	MSC2	AT1	SB1	SB2	SB3	MOS1	MOS2	REL1	REL2	Test F
Mean of ag- gres- sive- ness	4.12 c.d	5.95 A	2.85 E	3.35 d.e	4.98 B	4.55 C	2.55 F	4.25 c.d	5.05 B	3.25 d,e	30.5**

Legend : ** Highly significant effect.

TABLE 5
Reaction of the chickpea lines to *Ascochyta rabiei*

Lines	MSC1	MSC2	AT1	SB1	SB2	SB3	MOS1	MOS2	REL1	REL2
Col 08	7.0	8.0	6.0	6.0	5.0	6.0	8.0	6.0	7.0	6.0
F 97-657	5.0	6.0	5.0	5.0	3.0	5.0	3.0	5.0	5.0	1.0
ILC 3279	3.0	3.0	3.0	5.0	3.0	3.0	5.0	5.0	3.0	5.0
GP 10	7.0	6.0	5.0	6.0	7.0	8.0	8.0	7.0	6.0	6.0
F 03-19C	5.0	4.0	5.0	3.0	3.0	4.0	5.0	3.0	4.0	3.0
Col 15/24	6.0	8.0	5.0	7.0	8.0	6.0	5.0	8.0	7.0	5.0
Flip 05-69C	4.0	5.0	3.0	5.0	6.0	5.0	3.0	5.0	4.0	5.0
INRA199	7.0	4.0	5.0	5.0	4.0	5.0	6.0	4.0	6.0	6.0
F 10-5/11	6.0	3.0	1.0	6.0	5.0	3.0	5.0	3.0	4.0	5.0
F 482	3.0	5.0	1.0	6.0	5.0	6.0	4.0	3.0	5.0	3.0
ILC 482	7.0	8.0	8.0	6.0	5.0	6.0	4.0	5.0	7.0	6.0
F1025	8.0	6.0	7.0	6.0	7.0	4.0	8.0	6.0	7.0	5.0

ppds F1et F2 = 1,254, ppds F1 x F2 = 4,102 et 6.033 ; C.V= 18.20%.

TABLE 6
Reaction of the chickpea lines after inoculation by 10 isolates of *A.rabiei*

Lines	ILC 482	ILC 3279	INRA 199	Col 25/24	Flip 0569 C	Col 08	GP 10	F 0319C	F 97-657	F 1025	F 482	F Test F 10-5/11
Reac- tion	5.7 5 A	4.34 Bcd	4.42 Bcd	5.14 Abc	4.55 Cd	4.9 5 C	4.6 2 cd	4.09 D	4.45 Bcd	5.45 Ab	4.2 5 Cd	4.15 d 5.36*

* Significant

TABLE 7
Reaction of the varieties of chickpea with effect the isolates of *Ascochyta rabiei*

Lines	ILC 482	ILC 3279	INRA 199	Col 25/24	Flip 05-69 C	Col 08	GP 10	F 03-19 C	F 97-657	F 1025	F 482	F 10-5/11
MSC1	S	R	S	S	T	S	S	T	T	S	R	T
MSC2	S	R	T	S	T	S	S	T	T	S	T	R
AT1	S	R	T	T	R	S	T	T	T	S	R	R
SB1	S	T	T	S	T	S	S	R	T	S	T	T
SB2	T	R	T	S	T	T	S	R	R	S	T	T
SB3	S	R	T	T	T	T	S	T	T	T	T	R
MOS1	T	T	T	T	R	S	S	T	R	S	T	T
MOS2	T	T	T	S	T	S	S	R	T	S	R	R
REL1	S	R	S	S	T	S	S	T	T	S	T	T
REL2	S	T	S	T	T	T	T	R	R	T	R	T

Legend: Resistant (R) = 1-3.9; Tolerant (T) = 4-5.9; Susceptible (S) = 6-7.9; Very Susceptible (VS) = 8-9 [14].

TABLE 8
Analysis of variance for pathogenicity of *A.rabiei* isolates studied (10 days after inoculation)
(Newman's test Keuls Seuil - 1%).

Source of variation	SSD	^a DF	^b MS	TEST F	PROBA	SD	CV
Isolate	645,124	12	75.01	30,50*	0		
Genotype	756,411	12	112.46	5,36*	0		
Isolate x Genotype	977,122	140	5.33	18.40*	0		
Error	257,145	512	1.25			0.8	18.20%

SSD: Sum of the squares of the deviations; ^aDF: Degrees of freedom; ^bMS: Medium square; SD: Standard deviation; CV: Coefficient of variation; * Significant at 0.01.

Regarding the evaluation of the aggressiveness of the isolates, the analysis of the results showed that the MSC2 isolate is more aggressive (5, 95 a) than all the others, with respect to the inoculated varieties, following the isolate REL1 (5.05 b), and finally isolates AT1 and MOS1 (2.85e and 2.55f) respectively non-aggressive. Isolates MSC1, SB1, SB3, MOS2 and REL2 are moderately aggressive (Groups b, c and d, Table 4). Isolates AT1 and MOS1 are non-aggressive (Groups e and f, Table 4), because the lines inoculated by it expressed resistance. The aggression study revealed three levels: highly aggressive isolates, moderately aggressive isolates and non-aggressive isolates. Similarly, considering the reaction of chickpea strains with respect to isolates of *A.rabiei*, we notice highly significant differences; this reaction varies from one line to another (Table 5 and Table 6). Considering the reaction of the lines to isolates of *Ascochyta rabiei*, we also noticed significant

differences between the lines tested. ILC3279 lines considered resistant in Algeria and other countries [24, 15, 21, 7]. The line ILC482, known to be tolerant, is sensitive to other isolates, these results are in line with those obtained by [14-25] and sensitive to most isolates as described for *A. rabiei* in Syria by [26]. Generally, the reaction of the different lines to isolates of *Ascochyta rabiei* varies between sensitivity, tolerance and resistance. Analysis of the Isolate (F1) x Variety (F2) interaction shows a significant effect (Table 5).

The following table (Table 7) groups the reactions of varieties against all the isolates tested.

The analysis of variance shows that the effects of the pathogen and the isolate as well as their interaction are significant for these parameters (Table 8).

Varieties ILC3279, F482 and F10-5/11 are generally resistant to tolerant for all tested isolates. The

varieties Flip05-69C, F03-19C and F97-657 are tolerant to isolates but resistant to others. Varieties ILC482, Col25/24, Col08, GP10 and F1025 are susceptible to 7 and 8 isolates and are tolerant to others. The INRA199 variety is tolerant to isolates (MSC2, AT1, SB1, SB2, SB3 MOS1 and MOS2), but susceptible to isolates (MSC1, REL1 and REL2). Through the results obtained, we can classify the different lines tested in the following categories:

Category 1: Tolerant to resistant varieties: ILC3279, F 482, F10-5 / 11 and F 03-19 C

Category 2: Varieties tolerant to all isolates: Flip 05-69 C, F97-657 and INRA199

Category 3: Moderately tolerant varieties with isolates: Col 25/24, Col 08 and GP 10

Category 4: Susceptible to moderately tolerant varieties: ILC482 and F 1025.

The study of the pathogenic variability of isolates of *Ascochyta rabiei*, allowed us to find some data to expand and develop knowledge about this fungus. The study of the pathogenicity of the isolates towards a range of different lineages, allowed us to note a significant difference in the aggressiveness of our isolates, as well as a difference in the reaction of the different tested lines, showing the existence of pathogenic variability in all isolates of *Ascochyta rabiei*. The results obtained on line ILC263 confirm their sensitivity to a large number of isolates. These are results indicated by some authors [14, 9]. We also observed that the incubation period varies between 5 and 6 days depending on the isolates, while the latency period lasts from 8 to 9 days [8]. In a similar study of the virulence of six (06) Algerian isolates tested on six (6) differential lineages [26] found that the incubation period varied between 8 and 9 days, whereas the latency varies between 10 and 13 days. Significant differences in the degree of severity were found in the isolate, concerning the evaluation of the degree of aggressiveness of our isolates, the results obtained allowed us to note that the isolates (MSC2, SB2 and REL1) are highly aggressive. The isolates (MSC1, SB1, SB3, MOS2 and REL2) are moderately aggressive and the isolates (AT1 and MOS1) are non-aggressive. These results allow us to classify these isolates into three (3) levels of aggressiveness: highly aggressive isolates, moderately aggressive isolates and non-aggressive isolates. This variability in aggression was also indicated by [16, 17-18 - 15]. [21, 8 -19, 20]. This variability in aggression was also indicated in Indian by [22]. The same study of pathogenic variation of different chickpea lines was obtained in Turkey by [23]. Considering the reaction of the lines to isolates of *Ascochyta rabiei*, we also noticed significant differences between the lines tested. ILC3279 lines considered resistant in Algeria and other countries [24- 15] [21, 7]. The line ILC482, known to be tolerant, is sensitive to other isolates, these results are in line with those obtained by [14, 25] and sensitive to most isolates as described for *A. rabiei* in Syria by [26]. Studies have been carried out

conducted to investigate the effectiveness of *Salvia officinalis* and *Salvia tomentosa* plant essential oils against 6 different isolates of *A. rabiei* pathogen causing significant loss in chickpea production areas [27]. There are several pathogenic diseases have been reported to cause economic losses in chickpea crop in Pakistan. It was also mentioned in the literature that around 50 pathogens of economic significance are affecting the chickpea plant and causing severe diseases [28, 29]. Generally, the reaction of the different lines to isolates of *Ascochyta rabiei* varies between sensitivity, tolerance and resistance.

CONCLUSION

The work we carried out consisted of studying the pathogenicity (aggressiveness and virulence test) of *Ascochyta rabiei* isolates collected in five (05) regions in western Algeria. The study of the pathogenicity made from the interaction of *A. rabiei* isolates with the different (introduced and local) chickpea lines; we found a pathogenic variability between the isolates studied. The results obtained show that the isolates do not attack the lines with the same level of aggressiveness and virulence. These results allowed us to classify our isolates into three (03) levels of aggressiveness: highly aggressive isolates, moderately aggressive isolates and non-aggressive isolates. This ranking shows us that there is a wide spectrum of variability in levels of aggression between isolates. We observed that the isolates (MSC2, SB2 and REL1) are highly aggressive, the isolates (MSC1, SB1, SB3, MOS2 and REL2) are moderately aggressive and the isolates (AT1 and MOS1) non-aggressive. Regarding the reaction of the chickpea strains tested to isolates, shows a variability between isolates studied: resistant to resistant lines (ILC3279, F482, F10-5 / 11 and F03-19C), lines tolerant of all isolates (Flip05-69C, F97-657 and INRA199), moderately tolerant lines (Col25 / 24, Col08 and GP10) and susceptible to tolerant lines (ILC482 and F1025). We have demonstrated that some chickpea lines considered to be resistant to anthracnose are in the case of ILC3279. The results obtained on the line (ILC263) confirm their sensitivity to a large number of isolates. The results obtained on the virulence test allowed us to classify the reaction of the different lines tested with isolates of *Ascochyta rabiei* in three (03) categories: sensitive, tolerant and resistant. From the results obtained it can be said that the thorough knowledge of this pathogen is essential for the choice of any means of control (for example: chemical and biological), it will be necessary to complete this work with another range of introduced lines. And other isolates from different regions of the west and the entire Algerian territory for a more complete characterisation. Through this study, we believe that pathogenic variability is necessary for an approach to molecular characterisation (for example SSR and

RAPD); important condition for obtaining more accurate results. On the other hand, this study should also be completed by comparing the isolates studied with previously identified strains of *A. rabiei*, in order to obtain elements of the answer, as to the identification of the physiological races of *A. rabiei* that exist in Algeria.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Ms Hamdi Samia from INRAA/URO (Sidi Bel Abbès, Algeria), who provided us differential chickpea germ-plasms and Ms Ouazani Karima headmistress of INPV (National Institute of Plant's Protection, Mostaganem, Algeria).

REFERENCES

- [1] MADR. (2014) Statistical Yearbook of the Ministry of Agriculture and Rural Development.
- [2] FAO Stat. (2013) Statistical database of the Food and Agriculture Organisation of the United Nations.
- [3] Labrousse, F. (1931) Anthracnose of chickpeas. Review of Pathology Vegetal and Entomology Agricultural. 28, 226-231.
- [4] Ahmad, F., Ahmad, I., Aqil, F., Ahmed, W.A. and Sousche, Y.S. (2006) Plant growth promoting blight (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.) in chickpeas. Journal of Turkish Phytopathology. 22, 17-26.
- [5] Gan, Y.T., Siddique, K.H.M., Mcleod, W.J. and Jayakumar, P. (2006) Management options for the damage by *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Field Crops Res. 97, 121-134.
- [6] Kanouni, H., Taleei, A. and Okhovat, M. (2011) *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.) of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Breeding strategies for resistance. International Journal of Plant Breeding and Genetics. 5(1), 1-22.
- [7] Benzohra, I.E., Bendahmane, B.S., Youcef Benkada, M. and Labdi, M. (2015) Screening of 15 chickpea Germplasm accessions for resistance to *Ascochyta rabiei* in North West of Algeria. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science. 15(1), 109-114.
- [8] Benzohra, I.E., Bendahmane, B.S., Labdi, M. and Youcef Benkada, M. (2011) Identification of Pathotypes and Physiological Races in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., the agent of *ascochyta* blight in chickpea (*Cicer arietinum*) in Algeria. World Applied Sciences Journal. 15(7), 978-984.
- [9] INRASBA. (2015) National Institute of Agronomic Research of Sidi Bel Abbès. Algeria. Differential chickpea germ-plasms. World Journal of Agricultural Sciences. 6(5), 630-634.
- [10] Jamil, F.F., Haq, I., Sarwar, N., Alam, S.S., Khan, J.A., Hanif, M., Khan, I.A., Sarwar, M. and Haq, M.A. (2002) Screening of ten advanced chickpea lines for blight and wilt resistance. The Nucleus. 39, 95-100.
- [11] Dolar, F.S., Tenuta, A. and Higgins, V.J. (1994) Detached leaf assay for screening chickpeas for resistance to *Ascochyta* blight. Canadian Journal of Plant Pathology. 16, 215-220.
- [12] Reddy, M.V. and Singh, K.B. (1984) Evaluation of a world collection of chickpea germplasm accessions for resistance to *Ascochyta* blight. Plant Disease. 68, 900-901.
- [13] Türkkan, M. and Dolar, F.S. (2009) Determination of pathogenic variability of *Didymella rabiei*, the agent of *ascochyta* blight of chickpeas in Turkey. Turkish Journal of Agricultural Forest. 33, 585-591.
- [14] Iqbal, S.M., Ghafoor, A., Ayub, N. and Ahmad, Z. (2004) Pathogenic diversity in *Ascochyta rabiei* isolates collected from Pakistan. Pakistan Journal of Botany. 36(2), 429-437.
- [15] Zikara-Zine, F. and Bouznad, Z. (2007) Virulence and compatibility groups in isolates of *Ascochyta rabiei* in Algeria. INRAA, Algerian National Institute of Agronomic Research. 19, 48-55.
- [16] Jamil, F.F., Sarwar, N., Sarwar, M., Khan, J.A., Geistlinger, J. and Kahl, G. (2000) Genetic and pathogenic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. populations in Pakistan causing blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Physiological and Molecular Plant Pathology. 57, 243-254.
- [17] Chen, W., Coyne, C.J., Peever, T.L. and Muehlbauer, F.J. (2004) Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of *Ascochyta* blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*. Plant Pathology. 53, 759-769.
- [18] Chongo, G., Gossen, B.D., Bushwaldt, I., Adhikari, T. and Rimmer, S.R. (2004) Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. Plant Disease. 88, 4-10.
- [19] Jayakumar, P., Gossen, B.D., Gan, Y.T., Banniza, S. and Warkentin, T.D. (2005) *Ascochyta* blight of chickpea: Influence and host resistance mechanisms. Canadian Journal of Plant Pathology. 27, 499-509.
- [20] Ben Mbarek, K. (2011) Behavior of chickpea (*Cicer arietinum* L.) of the kabuli type with respect to water stress and identification of drought tolerant genotypes, University of Sousse Chott-Mariem, Tunisia.

- [21] Mahiout, D., Bendahmane, B.S., Youcef Benkada, M. and Martina, R. (2015) Physiological Characterisation of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. Isolated from Diseased Chickpea Fields in Six Regions of Northwestern Algeria. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science. 15(6), 1136-1146.
- [22] Basandrai, A.K., Pande, S., Krishna-Kishore, G., Crouch, J.H. and Basandrai, D. (2005) Cultural Morphological and Pathological Variation in Indian Isolates of *Ascochyta rabiei*, the Chickpea Blight Pathogen. Plant Pathology Journal. 21(3), 207-213.
- [23] Ozkilinc, H., Frenkel, O., Shtienberg, D. and Abbo, M. (2011) Aggressiveness of eight *Didymella rabiei* isolates from domesticated and wild chickpea native to Turkey, a case study. Eurasian Journal of Plant Pathology. 131(3), 529-537.
- [24] Labdi, M. (1995) Study of resistance to anthracnose (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). National School of Agricultural Sciences. Montpellier, France.
- [25] Pande, S., Siddique, K.H.M., Kishore, G.K., Bayaa, B., Gaur, P.M., Gowda, C.L.L., Bretag, T.W. and Crouch, J.H. (2005) *Ascochyta* blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review of biology, pathogenecity and disease management. Australian Journal of Agricultural Research. 56, 317-332.
- [26] Atik, O., Ahmed, S., Abang, M.M., Imtiyaz, M., Hamwieh, A., Baum, M., El-Ahmed, A., Murad, S. and Yabarak, M.M. (2013) Pathogenic and genetic diversity of *Didymella rabiei* affecting chickpea in Syria. Crop Protection. 46, 70-79.
- [27] Yilar, M. and Bayar, Y. (2019) Antifungal potential of essential oils of *Salvia officinalis* and *Salvia tomentosa* plants on six different isolates of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. Fresen. Environ. Bull. 28(3), 2170-2175.
- [28] Jamrol, H.U.R., Khaskhelil, M.I., Maril, J.M. and Rustamani, M.A. (2019) Mycoflora Associated with gram pod borer affected Chickpea. Fresen. Environ. Bull. 28(4), 4054-4071.
- [29] Alkan, M., Erturk, S., Firat, T.A. and Ciftci, E. (2019) Study of insecticidal and behavioral effects and some characteristic of native diatomaceous earth against the bean weevil, *Acanthosclides Obiectus* (Coleoptera: Chrysomelidae). Fresen. Environ. Bull. 28 (5), 2916-2922.

Received: 17.11.2019

Accepted: 03.10.2021

CORRESPONDING AUTHOR

Bettouati Abdelkader

Faculty of Agronomic Science and Biotechnology,
University Hassiba Ben Bouali of Chlef,
02000 – Algeria

e-mail: bettouatiabdelkader@yahoo.com

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- ❖ **AAC. 2020.** Agriculture et Agroalimentaire Canada. Statistiques Canada sur la superficie, le rendement et la production pour 2020-2021.
- ❖ **Abang, M.M., Malhotra, R. 2008.** Chickpea and climate change. ICARDA Caravan – Rev Agric Dry Areas 25:48–50
- ❖ **Abdelguerfi, A., Laouar, M., Hamdi, N., Bouzid, H., Zidouni, F., Laib, M., Bouzid, L., Zine, F. 2001a.** Les légumineuses alimentaires en Algérie : situation, état des ressources phytogénétiques et cas du pois chiche à Béjaia. 3èmes journées Scientifiques de l'INRAA, Béjaia, 11-13.
- ❖ **Abd-El salam, K. A., Khalili, M.S., Aly, A.A. and Asran-Amal, A. 2002.** Genetic diversity among *Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum* isolates revealed by UP-PCR and AFLP markers. *Phytopathol. Mediterr.*, 41, 1-7.
- ❖ **Agrios, G. N. 2005.** Plant Pathology. 5th ed. Amsterdam:Elsevier/Academic Press.
- ❖ **Agrios, G. N. 1988.** Plant pathologie. 3rd édit, académie press, 803 p.
- ❖ **Akem, C.N., 2001.** Integrated management of ascochyta blight of chickpea. *In*: proceedings of the 13th Biennial Conference of the Australasian Plant Pathology Society, Cairns, Australia, 24-27 September; 160p
- ❖ **Akem, C. 1999.** Ascochyta blight of chickpea: Present status and future priorities. *Int. J. Pest Manag.* **45** : 131-137
- ❖ **Alam S.S., Bilton J.N., Slawin A.M.Z., 1989.** Chickpea blight: production of the phytotoxins solanapyrones A and C by *Ascochyta rabiei*. *Phytochemistry* 28: 2627-2630.
- ❖ **Alam, S.S., Bilton J.N., Slawin, A.M.Z., William, D.J., Sheppard, R.N. and Strange, R.N., Alfenas, A.C., Jeng, R. and Hubbes, M. 1984.** Isozyme and proteins Production of a proteinacious phytotoxin by *Ascochyta rabiei* grown in expressed chickpea sap (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem* 46(11): 941-50.
- ❖ **Ali, H., Haq, M.A., Shah, T.M., Rahman, M., Chen, W. 2012 a.** Validation of molecular markers for resistance among Pakistani chickpea germplasm to races of *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. *Eur. J. Plant Pathol.* 132: 237-244.
- ❖ **Ali Q., Waseem M., Ahsan A., Nadeem T., M.N., Farooq J., Anwar M., Ahmad W., 2011.** Molecular markers and QTLs for *Ascochyta rabiei* resistance in chickpea. Disponible sur: www.scopemed.org/?mno=7485.

- ❖ **Ali, S. k. Z, Sandhya, V., Grover M., Kishore, N., Rao, L.V., and Venkateswarlu, B. 2009b.** *Pseudomonas* sp. strain AKM-P6 enhances tolerance of sorghum seedlings to elevated temperatures. *Biol. Fert. Soils.* 46: 45–55
- ❖ **Ali, S. R., Iqbal, S. M., Iqbal, U., Ghafoor, A. et Akram, A. 2009a.** Pathogenic diversity in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. of chickpea. *Pak. J. Bot.* **41 (1)**: 413-419.
- ❖ **Allen, G., Pereiral, L., Races, D. and Smith, M. 1998.** Crop evapotranspiration guidelines for computing crop water requirement FAO Irrigation and drainage, 56 p.
- ❖ **Alvarez, M. Y. and Moreno, A. 1984.** Identification de hongos causante de pudricion radicular en garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Agriculture Technica (Chile).* 44 (3) : 253-258.
- ❖ **Ameziane, E. A. 1979.** Quelques aspects de la biologie d'*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. Thèse DEA an Agronomie, Université de Rennes I. 28 p.
- ❖ **Ameziane, E. A. 1981.** Modalité d'expression de la résistance d'un cultivar de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) à *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. Thèse de Docteur – ingénieur. ENSA Rennes. 41 p.
- ❖ **Andersen, B., Hansen, M. E., Smedsgaard, J. 2005.** Automated and unbiased image analyses as tools in phenotypic classification of small-spored *Alternaria* spp. *Phytopathology* 95: Pp1021-1029.
- ❖ **Andrabi, M., Vaid, A., and Razdan, V.K. 2001.** Evaluation of different measures to control wilt causing pathogens in chickpea. *Journal of plant protection research* **51 (1)**: 55- 59.
- ❖ **Angelova, Z., Georgiev, S., Roos, W. 2006.** Elicitation of plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipments*, 20(2):72-83.
- ❖ **Anikster, Y., Eilam, T., Bushnell, W.R., Kosman, E. 2005.** Spore dimensions of *Puccinia* species of cereal hosts as determined by image analysis. *Mycologia*, 97(2), Pp. 474–484.
- ❖ **Anikster Y., Szabo L. J., Eilam T., Manisterski J., Koike S. T., et Bushnell W. R., 2004.** Morphology, Life Cycle Biology, and DNA Sequence Analysis of Rust Fungi on Garlic and Chives from California. *Phytopathology* 94: Pp569-577.
- ❖ **Ansar Ahmad, M. 2010.** Variability in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for Chickpea Wilt Resistance in Pakistan. Thèse de Doctorat, 162p.
- ❖ **Apuya, N.R., Frazier, B.L., Keim, P., Roth, E.J. and Lark, K.G. 1988.** Restriction fragment length polymorphism as a genetic markers in soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. *Theor. Appl. Genet.*, 75, 889-901.

- ❖ **Arfaoui, A., Sifi, B., Hassni, M., Hadrani, I., Boudabbous, A., Cherif, M. 2005.** Biochemical analysis of chickpea protection against *Fusarium* wilt afforded by two *Rhizobium* isolates. *Plant Pathology Journal*, 4(1):35-42.
- ❖ **Armstrong, CL., Chongo, G., Gossen, BD., Duczek, L.J. 2001.** Mating type distribution and incidence of the Teleomorph of *Ascochyta rabiei* (*Didymella rabiei*) in Canada. *Can J Plant Pathol* 23:110– 113.
- ❖ **Armstrong, C. L., Gossen, B. D. et Chongo, G. 2004.** Impact of continuous or interrupted leaf wetness on infection of chickpea by *Ascochyta rabiei*. *Can. J. Plant Pathol.* 26 : 134-141.
- ❖ **Armstrong, C. L., Wolf, T., Chongo, G., Gan, Y., Hogg, T., Lafond, G., Johnson, E. et Banniza, S. 2008.** The effect of carrier volume on *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei*) control in chickpea. *Crop Protection* 27: 1020 – 1030.
- ❖ **Atik, O., Ahmed, S., Abang, M.M., Imtiyaz, M., Hamwieh, A., Baum, M., El-Ahmed, A., Murad, S., Yabrak, M.M. 2013.** Pathogenic and genetic diversity of *Didymella rabiei* affecting chickpea in Syria. *Crop Protection* 46 : 70-79. doi 10.1016/J.CROPRO.2012.12.012.
- ❖ **Atik, O., Baum, M., El-Ahmed, A. 2011.** Chickpea *Ascochyta* blight: Disease status and pathogen mating type distribution in Syria. *J. Phytopathol* 159: 443–449
- ❖ **Atik, O., Seid, A., Abang, M.M., Imtiyaz, M. 2013.** Pathogenic and genetic diversity of *Didymella rabiei* affecting chickpea in Syria. *Crop Protection* 46: 70–79.
- ❖ **Aujla, S.S. 1964.** Study on eleven isolates of *Phyllosticta rabiei* Pass. Trot., the causal agent of gram blight in the Punjab. *Indian Phytopathol* 17: 83-87.
- ❖ **Ayad, D., Sayoud, R., Benbelkacem, K., Bouznad, Z. 2014.** La tache septorienne du blé: Première signalisation de la présence en Algérie des deux Mating types du téléomorphe *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schröter, (anamorphe: *Septoria tritici* Rob. Ex Desm.) et diversité phénotypique de l'agent pathogène. *Nature et Technologie* 11:34-45.
- ❖ **Bahous, M., Ouazzani Touhami, A., Badoc, A., Douira, A. 2005.** Effets de l'azoxystrobine sur la pyriculariose, l'helminthosporiose et la curvulariose du riz. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 144: 27-46 ; doi 10.4141/CJPS07019.
- ❖ **Bahri, B., Leconte, M., de Vallavieille-Pope, C., Enjalbert, J. 2009.** Isolation of ten microsatellite loci in an EST library of the phytopathogenic fungus *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*. *Conserv Genet.* 10: Pp1425–1428.

- ❖ **Bahti, P., et Strange, R. N. 2004.** Chemical and biochemical reactions of solanapyrone A, a toxin from chickpea pathogen, *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. . *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64: 9-15.
- ❖ **Barve, MP., Arie, T., Salimath, S., Muehlbauer, F.J., Peever, T.L. 2003.** Cloning and characterization of the mating type (MAT) locus from *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) and a MAT phylogeny of legume-associated *Ascochyta spp.* *Fungal Genet Biol* 39:151–167..
- ❖ **Basandrai, A. K., Pande, S., Krishna-Kishore, G., Crouch, J. H., et Basandrai, D. 2005.** Cultural, morphological and pathological variation in indian isolates of *Ascochyta rabiei*, the chickpea blight pathogen. *Plant Pathology Journal* 21 (3) : 207-213.
- ❖ **Bashir, M., et Illys, D. 1986.** Screening of chickpea genotypes for resistance to six races of blight. *International Chickpea Newsletter* 10: 27-29
- ❖ **Bashir, M., Haware, M. P., Kabbabeh, S. et Malhotra, R. S. 1987.** Screening of chickpea genotypes for resistance to six races of blight. *International Chickpea Newsletter* 10: 27-29.
- ❖ **Bayaa, B., Udupa, S.M., Baum, M., Malhotra, R.S., Kabbabeh, S. 2004.** Pathogenic variability in Syrian isolates of *Ascochyta rabiei*. 5th European Conference on Grain Legumes: Conference Handbook 5th European Conference of Grain Legumes. 2nd International Conference on Legume Genomics and Genetics, 7–11 June 2004. Dijon, France, European Association for Grain Legumes Research (AEP), pp 306.
- ❖ **Bayaa, B., Chen, W. 2011.** *Ascochyta* blight of chickpea. In: 0T Chen W 0T, Sharma HC, Muehlbauer FJ, eds. 2T 2T *Compendium of Chickpea and Lentil Diseases and Pests*. p. 34-40.
- ❖ **Bayraktar, H., Dolar, F.S., and Tör, M. 2007.** Determination of genetic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., The case of *Ascochyta* Blight of chickpea in Turkey. *J. Plant Pathol.*, 89 (3), 341-347.
- ❖ **Bayraktar, H., Dolar, F. S. et Maden, S. 2007.** Mating type groups of *Ascochyta rabiei* (Teleomorph : *Didymella rabiei*), the causal agent of chickpea blight in central Anatolia. *Turkish Journal of Agriculture* 31 : 41-46.
- ❖ **Bekkar, A. A. 2007.** Variabilité de la morphologie et du pouvoir pathogène chez *Fusarium oxysporum* Schelcht. Emend . Snyder. & Hans. f. sp. *Ciceri* (Padwick), agent du flétrissement vasculaire du pois chiche (*Cicer arietinum* L.). Mémoire de Magister, Université de Mascara, Mustapha Istambouli, Algérie, pp 92.

- ❖ **Belabid, L. 2003.** La fusariose vasculaire de la lentille (*Lens culinaris* Med.) dans le Nord- Ouest Algérien : Morphologie et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Emend. S. & H. f. sp. *lentis* (Vasud. & Srin.) en relation avec la répartition géographique et le pouvoir pathogène. Thèse de Doctorat, Université d'Oran.
- ❖ **Belabid, L., Fortas, Z. 2011.** La fusariose vasculaire de la lentille dans le nord-ouest Algérien. Morphologie, pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* (Schlecht) Emend. S. et H. f. sp. *lentis* (Vasud. et Srin.). Ed. Universitaires européennes, Allemagne, 159 p.
- ❖ **Belabid L., Fortes Z., 2011.** Pathogenic and Genetic Characterization of Algerian Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis. Afr. J. Biotechnol. 3: 25-31.
- ❖ **Ben Freha, F., Benyeless, M., et Merzoug, A. 2010.** La fusariose vasculaire du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) dans le nord ouest algérien : extension et dégâts. 1^{er} séminaire National sur la protection des plantes cultivées, Centre Universitaire de Khemis Miliana, Institut des Sciences de la Nature et de la terre .p.62.
- ❖ **Ben Mbarek, K. 2011.** Comportement du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) du type « kabuli » vis-à-vis du stress hydrique et identification de génotypes tolérant la sécheresse. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, 280p.
- ❖ **Benabdeli, K., Louissi, M.,. et Belhadi, A. 2010.** Impact de la gestion négative des ressources naturelles (sol et eau) sur les potentialités alimentaires dans le monde arabe: cas de l'Algérie. Séminaire international sur la sécurité alimentaire et le libre échange. AMAECO Rabat (Maroc) 25-26 juin 2009.
- ❖ **Benzohra, I., Seddik Bendahmane, B., Labdi, M., and Youcef Benkada, M. 2009.** Contribution à l'étude de *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., agent causal de l'anthracnose du
- ❖ pois chiche (*Cicer arietinum* L.) : Caractérisation morphologique et étude du pouvoir pathogène. Thèse de Magister Université de Mostaganem. p55.
- ❖ **Benzohra, I., Seddik Bendahmane, B., Labdi, M., and Youcef Benkada, M. 2012.** Determination of pathotypes and physiological races in *Ascochyta rabiei*, the agent of ascochyta blight in chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Algeria. African Journal of Agricultural Research Vol. 7(7), pp. 1214-1219..
- ❖ **Benzohra, I.E., Bendahmane, B.S., Youcef Benkada, M., Labdi, M. 2015.** Screening of 15 Chickpea Germplasm Accessions for Resistance to *Ascochyta rabiei* in North West of Algeria. *American- Eurasian J Agric Environ Sci* 15(1): 109-114.

- ❖ **Berger, J. D., Ali, M., Basu, P. S., Chaudhary, B. D., Chaturvedi, S. K., Deshmukh, P. S., Dharmaraj, P. S., Dwivedi, S. K., Gangadhar, G. C., Gaur, P. M. 2006.** Genotype by environment studies demonstrate the critical role of phenology in adaptation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to high and low yielding environments of India. *Field Crops Research* 98: 230-244.
- ❖ **Berger ; J., Abbo; S., et Turne ;r N.C. 2003.** Ecogeography of annual wild Cicer species: The poor state of the world collection. In: *Plant Genetic Resources. Crop Sci.* 43: 1076-1090.
- ❖ **Bernier, M., Jeng, L.R.S., and Hubbes, M. 1984.** Differentiation of aggressive and non-aggressive isolates of *Ceratocystis ulmi* by electrophoresis of intramycelial enzymes. *Mycotaxon*, 17, 466-472.
- ❖ **Bhardwaj, R., Sandhu, J.S., Kaur, L., Gupta, S.K., Gaur, P.M., Varchney, R. K. 2010.** Genetics of Ascochyta blight resistance in chickpea. *Euphytica*.171:337-343.
- ❖ **Borchardt, D.S., Welz, H.G., and Geiger, H.H. 1998.** Genetic structure of *Setosphaeria turcica* populations in tropical and temperate climates. *Phytopathology*, 88, 322-329.
- ❖ **Bouznad, Z., Maatogui, M.E.H., et Labdi, M. 1996.** Importance et distribution géographique des maladies fongiques des légumineuses alimentaires en Algérie. In : Ezzahiri B., Lyamany A., Farih A. et El Lyamany M. Symposium régional sur les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires IMP, El Maarif Al Djadida, Rabat, Maroc : 13-19.
- ❖ **Bouznad, Z. 1989.** Contribution à la connaissance du genre *Ascochyta rabiei*. Cas particulier de l'étude biologique, ultrastructural et cytochimique des relations hôte-parasite chez le couple *Pisum sativum* L. et *Ascochyta pisi* Lab. Thèse de Doctorat d'Etat de l'Université de Pierre et Marie Curie, Paris VI. 217 p.
- ❖ **Bouznad, Z. 1991.** Bilan et programme de pathologie des légumineuses alimentaires. Projet de développement agricole de Sidi Belabès
- ❖ **Bouznad, Z. 1978.** Contribution à la connaissance de quelques espèces biologiques et physiopathologiques de l'anthracnose du pois chiche causée par *Ascochyta pisi*. Thèse de magister. INA. Alger pp : 149.
- ❖ **Bowley, S.R. 1999.** The *Hitchhiker's* Guide to Statistics in Plant Biology. Guelph, ON, Plants. Inc, pp 250
- ❖ **Bruns, R., et Barz, W. 2001.** Studies on cell number and nuclei in spores and on ploidy level in *Ascochyta rabiei* isolates. *Journal of Phytopathology* **149** : 253-258.

- ❖ **Butler, E.J. 1918.** Fungi and diseases in plants Calcutta, India: Thacher, Sprink and Co. 547pp.
- ❖ **Chahid, A.A., Husnain, T., et Riazuddin, S. 2008.** Ascochyta blight of chickpea: Production of phytotoxins and disease management. *Biotechnol. Adv.*, 26: 511–515.
- ❖ **Chandirasekaran, R. 2007.** Options for reducing *Ascochyta* blight severity in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Thèse de Magister en sciences végétales. Université de Saskachewan, Saskatoon, Canada. P.1- 20.
- ❖ **Chang, K.F., Ahmed, H.U., Hwang, S.F., Gossen, B.D., Strelkov, S.E., Blade, S.F., Turnbull, G.D. 2007.** Sensitivity of field populations of *Ascochyta rabiei* to chlorothalonil, mancozeb and pyraclostrobin fungicides and effect of strobilurin fungicide on progress of ascochyta blight of chickpea. *Canadian Journal of Plant Sciences* 87(4): 937-944
- ❖ **Chattopadhyay, D., et Bhatia, S. 2012.** High-Throughput SNP Discovery and Genotyping. (Eds.), Encyclopedia of Grain Science. Academic Publishers, United Kingdom: 287-295.
- ❖ **Chaudhry, S.E, Iqbal, J., Mustafa, A. 2009.** Efficacy of different fungicides for the control of downy mildew of cucumber. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 19(4): 202-204.
- ❖ **Chebbi, H., Pascual-Villalobos, M.J., Cenis, J.L., Correal, E. 1995.** Caractérisation morphologique et moléculaire des espèces ligneuses du genre *Medicago*. *Fourrages* 142, Pp191-206.
- ❖ **Chekroun, C., 2011.** Etude des effets des filtrats de culture d'*Ascochyta rabiei* (Pass) Lab., agent de l'antracnose sur des cals de *Cicer arietinum*. Thèse de magister, Université d'Oron. 4p.
- ❖ **Chen, W, Coyne, C.J., Peever, T.L., Muhlbauer, F.J. 2004.** Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of ascochyta blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*. *Plant Pathology* 53: 759-769.
- ❖ **Chen, X., Lin,e R.F., and Leung, H.. 1993.** Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. *Phytopathology*, 83, 1489-1497.
- ❖ **Chen, X., Penman, L. 2005.** Races of *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*, the pathogen of barley stripe rust in the United States in 2004. *Barley Genetics Newsletter* 35: Pp23-26.
- ❖ **Chen, Y.M., and Strange, R.N. 1991.** Synthesis of the solanapyrone phytotoxins by *Ascochyta rabiei* in response to metal cations and development of a defined medium for toxin production. *Plant Pathol.*, **40**: 401-407.

- ❖ **Chen, W., Coyne, C. J., Peever, T. L. et Muehlbauer, F. J. 2004.** Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of *Ascochyta* blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*. *Plant Pathology* **53**: 759-769.
- ❖ **Chérif, M., Arfaoui, A., Rhaïem, A. 2007.** Phenolic compounds and their role in biocontrol and resistance of chickpea to fungal pathogenic attacks. *Tunisian J Plant Protection* (2): 7-21.
- ❖ **Chettou, A., Sbaghi, M., Msetef, Y. 2005.** Résistance partielle et interaction hôte-pathogène dans l'association *Ascochyta rabiei* - *Cicer arietinum*. *AL Awamia* **114**(2): 2.
- Canadian J. Plant Pathol.**, **23**: 358-363.
- ❖ **Chongo, G., Gossen, B.D, Buchwaldt, L, Adhikari, T., Rimmer, S.R. 2004.** Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. *Plant Disease* **88**: 04 – 10.
- ❖ **Chongo, G., and Gossen, B. 2001.** Effect of plant age on resistant to *Ascochyta rabiei* in chickpea. *Canadian J. Plant Pathol.*, **23**: 358-363.
- ❖ **Chongo, G., Buchwaldt, L., Andeson, K. et Gossen, B. D., Lafond, G. P., May, W. E., Johnson, E. N., et Hogg, T. 2003.** Foliar fungicides to manage *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei*) of chickpea in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* **25** : 135-142.
- ❖ **Chongo, G., Gossen, B. D., Buchwaldt, L., Adhikari, T. et Rimmer, S. R. 2004.** Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. *Plant Disease* **88** : 04 – 10.
- ❖ **Cochrane, V.,W. 1958.** Physiology of fungi. Wiley Eds. New Yourk. Pp.588.
- ❖ **Collignon-trontin, A.M. 2000.** Etude des variations moléculaires chez l'Epicéa commun (*Picea abies* L.) Karst.) à l'aide de marqueurs RAPD. Thes. Doc. Université Henri Poincaré, NANCY-I en Biologie Forestière. P165.
- ❖ **Corbaz, J. 1991.** Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. *Presses phytotechniques et universitaires romandes*; 286 p.
- ❖ **Daayf, F. et Platt, H.W. 2002.** Variability in responses of US–8 and US–11 genotypes of potato and tomato isolates of *Phytophthora infestans* to commercial fungicides *in vitro*. *American Journal of Potato Research* **79**: 433–441.
- ❖ **Davidson, J.A., Kimbe,r R.B.E. 2007.** Integrated disease management of *Ascochyta* blight in pulse crops. *European Journal of Plant Pathology*, **119**:99-110.
- ❖ **Davidson, J.A., Pande, S., Bretag, T.W., Lindbeck, K.D. and Kishore, G.K., In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynsky, P. and Delen, N. 2004.** Editors, Biology, pathology and control. Kluwer Academic Publishers. The Netherland. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **25**:1135–1141.

- ❖ **Davis, P.H. 1969.** Material for a flora of Turkey, XIX -Leguminosae-Viciae, *Notes Roy Bot Gard.* Ed., 29:312- 313.
- ❖ **Demirci, F., Bayraktar, H., Babaliogullu, I., Dolar, F. S. et Maden, S. 2003.** *In vitro* and *In vivo* effects of some fungicides against the chickpea blight pathogen, *Ascochyta rabiei*. *Journal of Phytopathology* **151**: 519-524.
- ❖ **Dixon, R.A., Paiva, N. 1995.** Stress induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant cell*, 7:1085-1097
- ❖ **Djellali, A. 1988.** Etude en plein champ de la résistance du pois chiche à l'antracnose. Thèse d'Ing. En agronomie. INA. El- Harrach, Alger, Algérie. 47p.
- ❖ **Dolar, F.S. 1997.** Effect of leaf age and inoculum Concentration on resistance of detached chickpea leaflets to two different races of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. *Tarim Bilmleri Dergisi* 3(1): 19-23.
- ❖ **Dolar, F.S., Tenuta, A. et Higgins, V. J. 1994.** Detached leaf assay for screening chickpea for resistance to *Ascochyta* blight. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16: 215 – 220.
- ❖ **Dos Santos, A.M.P.V., Matsumura, A.T.S. and Vander Sand, S.T. 2002.** Intraspecific genetic diversity of *Drechslera tritici-repentis* as detected by random amplified polymorphic DNA analysis. *Genet. Mol. Biol.*, 25, 243- 250.
- ❖ **Doukken-Bouchard, F., Miller, S., McCall, P., Mcvicar, R. 2010.** Scouting and management of ascochyta blight in chickpea. AAF Canada, Pesticide Risk Reduction Program Pest management Centre, Saskachewan, Canada. 19p.
- ❖ **Dusunceli, F., Meyveci, K., Cetin, L., Avci, M., Surek, D., Albustan, S., Mert, Z., Akan, K., Karacam, M., Stange, M. 2007.** Determination of agronomics practices for the management of blight of chickpea caused by *Ascochyta rabiei* in Turkey:1. Appropiatesowing date. *European Journal of Plant Pathology*, 119(4): 449-456.
- ❖ **Dutech, C., Enjalbert, J., Fournier, E., Delmotte, F., Barrès, B., Carlier, J., Tharreau, D. and Giraud, T. 2007.** Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 44, 933-949.
- ❖ **Ebel, J., Thöfer, A. 1998.** Early events in the elicitation of plant defence. *Planta*, 206:335-348
- ❖ **Edwards, J., Ades, P. K., Parbery, D. G., Halloran, G. M. et Taylor, P. W. J., 1999.** Morphological and molecular variation between Australian isolates of *Puccinia menthae*. *Mycol. Res.* 103(12) : Pp 1505-1514.
- ❖ **El Aoufir, A. 2001.** Etude du flétrissement vasculaire du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) causé par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri*. Evaluation de la fiabilité de l'analyse

- isoenzymatique et de la compatibilité végétative pour la caractérisation des races physiologiques. Ph. D. de la faculté des sciences de l'agriculture, Univ. Laval, Québec, Canada. 178p.
- ❖ **El biari, M. 1995.** Etude de la résistance à l'antracnose *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. Chez le pois chiche (*Cicer arietinum* L.). Thèse de doctorat, option Phytopathologie. U.F.R. Scientifique d'Orsay.
 - ❖ **Errakhi, R. 2008.** Contribution d'actinomycètes (Actinobacteries) à la lutte biologique contre *Sclerotium rolfsii* et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense. Thèse de Doctorat. Université Cadi Ayyad, Marrakech Maroc.
 - ❖ **Fahim, N. M., Osman, A. R., El- Attar, A.H. and Mabrouk, M. S. M. 1987.** Root rot of common bean. *Egyptian Journal of Phytopathology*. **19**: 71 – 83.
 - ❖ **FAO, 2016.** [En ligne], <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC>.
 - ❖ **FAOSTAT data, 2006.** Food and Agriculture Organisation of The United Nation, <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>.
 - ❖ **FAO, 2019.** Food and Agriculture Organisation of the United Nation <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/>.
 - ❖ **Field, D., Eggert, L., Metzgar, D., Rose, R., and 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.
 - ❖ **Fofana, A., Louanchi, M., Robin, P., Balesdent, M.H., and Despreaux, D. 1992.** Interspecific variation in soluble protein and isozyme patterns in *Rigidoporus lignosus*, the causal agent of white root disease on *Hevea brasiliensis*. *Indian J. Nat. Rubber Res.* 5, 141-150.
 - ❖ **Fravel, D.R. 2005.** Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of fight against *Ascochyta rabiei*. *RESEARCH* Pp 1– 17.
 - ❖ **Friesen, T.L., Ali, S., Klein, K.K. and Rasmussen, J.B. 2005.** Population genetic analysis of a global collection of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. *Phytopathology*, 95, 1144-1150.
 - ❖ **Frisvad, J.C., Bridge P.D. and Arora, D.K. 1998.** *Chemical fungal taxonomy*. New York: Marcel Dekker.
 - ❖ **Gan, Y.T, Siddique, K.H.M., Mcleod, WJ, Jayakumar, P. 2006.** Management options for minimizing the damage by ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Research* 97: 121-134.

- ❖ **Gan, Y. T., Siddique, K. H. M., Macleod, W. J. et Jayakumar, P. 2005.** Management options for minimizing the damage by *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Res.* **97** : 121-134.
- ❖ **Gaur, R. B. 2003.** Influence of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. On chlorophyll of chickpea. *Indian Journal of Plant Pathology* **28** : 208-210.
- ❖ **Gharbi, S., Karkachi, N., Chhiba, M., Kihal, M., Henni, D.E., 2015.** Comparison of *Ascochyta rabiei* isolates for cultural characteristics and isozyme.[En ligne], <http://www.innspub.net/wpcontent/uploads/2015/03/IJB-V6No4-p30-39.pdf>*International Journal of Biosciences* 6 (4): 30-39.
- ❖ **Gharbi, S., Karkachi, N., Kihal, M., Henni, J. E. 2013.** Carbon sources and pH effect on pectinolytic activity production by *Ascochyta rabiei* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) in West Algeria. *African Journal of Microbiology Research* 7(27): 3483-3488.
- ❖ **Gonzalez, M., Rodriguez, R., Zavala, M.E., Jacobo, J.L., Hernadez, F., Acosta, J., Martinez, O. and Simpson, J. 1998.** Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology*, 88, 292-299.
- ❖ **Goodwin, M., 2008.** Profil de la culture du pois chiche au canada. Centre pour la lutte antiparasitaire Programme de réduction des risques liés aux pesticides Agriculture et Agroalimentaire Canada 960, avenue Carling, immeuble 57 Ottawa (Ontario) KIAOC6 CANADA.
- ❖ **Goodwin, P.H. and Annis, S.L. 1991.** Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2482-2486.
- ❖ **Gossen, B.D. 2004.** Resistance to strobilurin fungicides in *Ascochyta rabiei*. Proc 5th Canadian Pulse Research Workshop, Lodon, ON, Nov. 29-30.
- ❖ **Grewal, J.S. 1984.** Evidence of physiologic races in *Ascochyta rabiei* of chickpea. In M.C. Saxena & K.B. Singh (eds.). Proceedings of the Workshop on Ascochyta Blight and Winter Sowing of Chickpeas , ICARDA, Aleppo, Syria, 55-65.
- ❖ **Grewal, J. S. 1982.** Control of important seed borne pathogens of chickpeas. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding.* **42** : 393 – 398.
- ❖ **Guignard, J .L. Khare, M. M., et Dupont, F. 2005.** Botanique. 13ème Edition Masson.

- ❖ **Guo, L.D. 2010.** Molecular diversity and Identification of endophytic fungi. In: Springer Heidelberg Dordrecht (eds.) *Molecular identification of fungi*. (pp. 277-296). London, England.
- ❖ **Hafiz, A. 1951.** Cultural studies on *Ascochyta rabiei* with special reference to zonation. Trans. Brit Mycol. Soc. 34: 259-269.
- ❖ **Hajeer, A. J., Worthington et John, S. 2000.** SNP and Microsatellite Genotyping: Markers for Genetic Analysis. Biotechniques: Molecular Laboratory Methods Series. Eaton Publishing, Manchester, UK.
- ❖ **Hamelin, R.C., Dusabenyagasani, M. and Et-touil, K. 1998.** Fine-level genetic structure of white pine blister rust populations. *Phytopathology*, 88, 1187-1191.
- ❖ **Hamwieh, A., Imtiaz, M., Hobson, K., Ahmed Kemal, S. 2013.** Genetic diversity of microsatellite alleles located at quantitative resistance loci for *Ascochyta* blight resistance in a global collection of chickpea germplasm. *Phytopathologia Mediterranea* 52(1): 183–191.
- ❖ **Hantula, J., Kurkela, T., Hendry, S., Yamaguchi, T. 2009.** Morphological measurements and ITS sequences show that the new alder rustin Europe is conspecific with *Melampsoridium hiratsukanum* in eastern Asia. *Mycologia*, 101(5) pp. 622–631.
- ❖ **Harveson, R.M., Markell, S.G., Goswami, R., Urrea, C.A., Burrows, M.E., Dugan, F., Chen, W., Skoglund, L.G. 2011.** *Ascochyta* blight of chickpeas. Online. *Plant Health Progress* doi: 10.1094/PHP-2011-0103-01-DG.
- ❖ **Haware, P.M., Nene, Y.L., Mathu,r S.B. 1986.** Seed borne diseases of chickpea. *Technical Bulletin of the Institute of Seed Pathology for Developing Countries* 1:8-15.
- ❖ **Haware, M. P. 1990.** Fusariose wilt and other important diseases of chickpea in the Mediterranean area. Option Mediterranean, series des siminaires. **9** :163 – 166.
- ❖ **Hawker, I., E. 1950.** Physiology of fungi. Univ. London. Press pp.321.
- ❖ **Henri, L., Alponse, M., Jose, D. 1995.** Cours de microbiologie.Ed. Paris.
- ❖ **Hernandez-Bello, M.A., Chilvers, M.I., Akamatsu, H., Peever, T.L 2006.** Host specificity of *Ascochyta* spp. infecting legumes of the *Viciae* and *Cicerae* tribes and pathogenicity of an interspecific hybrid. *Phytopathology* 96:1148-1156.
- ❖ **Hibar, K., Daami-Remadi, M., El Mahjoub, M. 2007.** Effets de certains fongicides de synthèse et biologiques sur la croissance mycélienne et l'agressivité de *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. *Tropicultura* 25 (3): 146-152.

- ❖ **Hohl, B., Pfantsch, M. et Barz, W. 1990.** Histology of disease development on resistant and susceptible cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) inoculated with spores of *Ascochyta rabiei*. *J. Phytopathol.* (Berlin) 129 : 31-45.
- ❖ **Hopkins, W. 2003.** Physiologie végétale, éd. De Boeck. Bruxelles, 2⁰ édition, P :514.
- ❖ **ICARDA, 2003.** Annual report of ICARDA 2003 International Center for the Agricultural Research in. the Dry Areas, Aleppo, Syria, pp: 33-36
- ❖ **ICARDA, 1985.** Chickpea pathology progress report 1982- 1983 food légume improvement program. ICARDA, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Alep, Syrie.
- ❖ **ICARDA. 1983.** Chickpea pathology progress report 1982-83 food legume improvement program. ICARDA, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Alep, Syrie.
- ❖ **Ilarslan, H. and Dolar, F.S. 2002.** Histological and ultrastructural changes in leaves and stems of resistant and susceptible chickpea cultivars to *Ascochyta rabiei*. *J. Phytopathol.*, 150: 340-348.
- ❖ **Imtiaz, M., Abang, M.M, Malhotra, R.S. 2011.** Pathotype IV, a new and highly virulent pathotype of *Didymella rabiei*, causing *Ascochyta* blight in chickpea in Syria. *Plant Disease* 95: 1192-1192.
- ❖ **Iqbal, S. M., and Ghafoor, A. 2005.** Screening of chickpea genotypes for resistance against *Fusarium* wilt. *Mycopath.* 3(1-2):1-5.
- ❖ **Iqbal, S.M., Ghafoor, A., Ayub, N. 2004.** Screening of chickpea germplasm against ascochyta blight disease. *Pakistan Journal of Agricultural Research* 18 (1): 8-15.
- ❖ **Iqbal, S.M, Hussain, S., Bakhsh, A., Bashir, M. 2002.** Sources of resistance in chickpea against ascochyta blight disease. *International Journal of Agriculture & Biology* 04(4): 488-490.
- ❖ **Iqbal, S. M., Ghafoor, A., Ayub, N. et Ahmad, Z. 2004.** Pathogenic diversity in *Ascochyta rabiei* isolates collected from Pakistan. *Pak. J. Bot.* **36 (2)** : 429-437.
- ❖ **ITGC, 2018.** La culture du pois chiche (*Cicer arietinum* L.). ITGC, Algérie; 5p.
- ❖ **Jaiswal, R. et Singh, N.P. 2001.** Plant Regeneration from NaCl Tolerant Callus/Cell Lines of Chickpea, International Chickpea and pigeonpea Newsletter; N°8; ICRISAT International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Andhra Pradesh; 73 pages.
- ❖ **Jamil, F. F., Sarwar, M., Sarwar, N., Khan, J. A., Zaid, H. M., Yousaf, S., Imran, H. M., Haq, I. 2010.** Genotyping with RAPD markers resolves pathotype diversity in the

- Ascochyta blight and Fusarium wilt pathogens of chickpea in Pakistan. *Pak J Bot* 42(2): 1369-1378.
- ❖ **Jamil, F. F., Haq, I., Sarwar, N., Alam, S. S., Khan, J. A., Hanif, M., Khan, I. A., Sarwar, M. et Haq, M. A. 2002.** Screening of ten advanced chickpea lines for blight and wilt resistance. *The Nucleus* 39 (1-2) : 95-100.
 - ❖ **Jamil, F. F., Haq, I., Sarwar, N., Alam, S. S., Khan, J. A., Hanif, M., Khan, I. A., Sarwar, M. et Haq, M. A. 2002.** Screening of ten advanced chickpea lines for blight and wilt resistance. *The Nucleus* 39 (1-2) : 95-100.
 - ❖ **Jamil, F. F., Sarwar, N., Sarwar, M., Khan, J. A., Geistlinger, J. et Kahl, G. 2000.** Genetic and pathogenic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. populations in Pakistan causing blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiology and Molecular Plant Pathology* 57: 243-254.
 - ❖ **Jayakumar, P., Gossen, B. D., Gan, Y. T., Banniza, S. et Warkentin, T. D. 2005.** *Ascochyta* blight of chickpea : Influence and host resistance mechanisms. *Canadian J. of Plant Pathol.* 27: 499 -509.
 - ❖ **Jennings, D. M., Ford-lloyd, B. V., Butler, G. M. 1990.** Morphological analysis of spores from different *Allium* rust populations. *Mycol. Res.* 94 (1): Pp83-93.
 - ❖ **Jhorar, O.P, Butler, D.R., Mathauda, S.S. 1998.** Effects of leaf wetness duration, relative humidity, light and dark on infection and sporulation by *Didymella rabiei* on chickpea. *Plant Pathology* 47: 586-594.
 - ❖ **Jhorar, O. P., Mathauda, S. S., Singh, G., Butler, D. R. et Mavis, H. S. 1997.** Relationship between climatic variables and *Ascochyta* blight of chickpea in Punjab (India). *Agr. Forest Meteor.* 87: 171-177.
 - ❖ **Jimenez-González, Diaz, R. M., Basallote, U. J. and Rapoport, H. 2008.** Colonization and pathogenesis in chickpea infected by races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Vascular Diseases of Plants.* 28: 113 – 918.
 - ❖ **Jimenez –Diaz, R. M., Basallote, U. J. and Rapoport, H. 1989.** Colonization and pathogenesis in chickpea infected by races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Vascular Diseases of Plants.* 28: 113 – 918.
 - ❖ **Jimenez-Diaz, RM., Trapero-Casas, A. 1988.** Improvement of chickpea resistance to wilt and root rot diseases. In: Proceeding on present status and future prospects of chickpea crop production and improvement in the mediterranean countries. 11-13 Jul., Zaragoza, Spain.

- ❖ **Jodha., N, S., Subba rao, K. V. 1988.** Chickpea World importance and distribution. Pp :1-10.
- ❖ **Jukanti¹, A. K., Gaur¹, P. M., Gowda¹, C. L. L. and Chibbar, R. N. 2012.** Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. British Journal of Nutrition, vol. 108, S1, pages S11-S26.
- ❖ **Kaiser, J., Kusmenoglu, I. 1997.** Distribution of mating types and the teleomorph of 2T *Ascochyta rabiei* 2Ton Chickpea in Turkey [en ligne], 81(11). (page consultée le 25/11/2016) 18T<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.1997.81.11.128418T>.
- ❖ **Kaiser, W,J. 1997.** Intra- and international spread of *Ascochyta* pathogens of chickpea, faba bean, and lentil. Can J Plant Pathol 19:215–224.
- ❖ **Kaiser, W. J. 1972.** Occurrence of three fungal diseases of chickpea in Iran. *FAO Plant Prot. Bull.* **20** : 74-78.
- ❖ **Kaiser, W. J. 1973.** Factors affecting growth, sporulation, pathogenicity and survival of *Ascochyta rabiei*. *Mycologia* **65** : 444-457.
- ❖ **Kaiser, W. J. 1987.** Testing and production of healthy plant germplasm. Technical Bulletin n°02, Copenhagen, Denmark: Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries.
- ❖ **Kaiser, W. J. 1992.** Epidemiology of *Ascochyta rabiei*. Pages 117-134 In: Disease resistance breeding in chickpea. Singh, K. B. et Saxena, M. C., eds. ICARDA, Alep, Syrie.
- ❖ **Kaiser, W. J. et Hannan, R. M. 1987.** First report of *Mycosphaerella rabiei* on chickpea in the western hemisphere. *Plant Disease* **71** : 192.
- ❖ **Kaiser, W.J., Hannan, R.M., 1983.** Etiology and control of seed decay and preemergence damping-off chickpea by *Pythium ultimum*. *Plant Disease* 67: 77-81.
- ❖ **Kamal, M. 1981.** The status of chickpea production and research in Morocco. Proceeding of workshop on *Ascochyta* blight and winter sowing of chickpea. (Saxena M. C. and Singh K. B. eds.). ICARDA, 4-7 May, Alep. Syrie .p. 247-257.
- ❖ **Kanouni, H., Taleei, A. and Okhovat, M., 2011.** *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.) of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Breeding strategies for resistance. *Int. J. Plant Breed. Genet.*,5: 1-22.
- ❖ **Kaur, S. 1995.** Phytotoxicity of solanapyrones produced by the fungus *Ascochyta rabiei* and their possible role in blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Sci.* 109 : 23-29.

- ❖ **Kavousi, H.R., Marashi, H., Mozafari, J. and Bagheri, A.R. 2009.** Expression of phenylpropanoid pathway genes in Chickpea defense against race 3 of *Ascochyta rabiei*. *Plant Pathology Journal*, 8(3), 127-132.
- ❖ **Kelly, A., Alcala-Jimenez, A. R., Bainbridge, B. W., Heale, J. B., Perez-Artes, E. and Jimenez-Diaz, R. M. 1994.** Use of genetic fingerprinting and Random Amplified Polymorphic DNA to Characterize Pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Infecting Chickpea. *The American Phytopathological Society*. **84**:1293-1298.
- ❖ **Kema, G.H.J., Goodwin, S.B., Hamza, S., Verstappen, E.C.P., Cavaletto, J.R., Van derlee, T.A.J., De Weerd, M., Bonants, P.J.M. and Wlwijk, C. 2002.** A combined amplified fragment length polymorphism and randomly amplified polymorphism DNA genetic linkage map of *Mycosphaerella graminicola*, in *Septoria tritici* leaf blotch pathogen of wheat. *Genetics*, 161, 1497-1505.
- ❖ **Kessmann, H. et Barz, W. 1987.** Accumulation of isoflavone and pterocarpan phytoalexins in cell suspension cultures of different cultivars of chickpea. *Plant Cell Rep.* 06 : 55-59.
- ❖ **Kevin, M., Mal, R., Gordon, C. et Leigh, J. 2013.** Chickpea: *Ascochyta* blight management. *Northern Pulse Bulletin, Australia*; 4 p.
- ❖ **Khan, M.S.A., Ramsey, M.D., Scott, E.S. 1999.** Host range studies with an Australian isolate of *Ascochyta rabiei*. *Australian Plant Pathology* 28: 170-173.
- ❖ **Khan, M. S. A., Ramsey, M. D., Cprdière, R., Infantino, A., Porta – Puglia, A., Bouznad, Z. et Scott, E. S. 1999.** *Ascochyta* blight of chickpea in Australia: Identification, pathogenicity and mating – type. *Plant Pathology* **48** : 230-234.
- ❖ **Khouaidja, D. M. 2000.** Etude de quelques aspects physiopathologiques de l'anthracnose du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) due à *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. Thèse magister en sciences agronomiques. Spécialité phytopathologie. I.N.A EL HARRACH, 149 p
- ❖ **Khune, M. M. et Kapoor, J. M. 1980.** *Ascochyta rabiei* sunonymous with *Phoma rabiei*. *Indian Phytopathology* **33** : 119-120.
- ❖ **Kim, W., Park, C.M., Park, J.J., Akamatsu, H.O. 2015.** Functional Analyses of the Diels Alderase Gene *Sol5* of *Ascochyta rabiei* and *Alternaria solani* Indicate that the Solanapyrone Phytotoxins Are not required for Pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, [en ligne] 28(4): 482- 496. Page consultée le 14/07/2016) 18Thttp://dx.doi.org/10.1094/MPMI-08-14-0234-R18T.

- ❖ **Kimber, R.B.E., Scott, E.S., Ramsey, M.D. 2006.** Factors influencing transmission of *Didymella rabiei* (ascochyta blight) from inoculated seed of chickpea under controlled conditions. *European Journal of Plant Pathology* 114:175–184. doi: 10.1007/s10658-005-4037-z.
- ❖ **Kohler, G., Linkert, C. et Barz, W. 1995.** Infection studies of *Cicer arietinum* L. with gus (*E. coli* β -glucuronidase) transformed *Ascochyta rabiei* strains. *J. Phytopathology* 143: 589-595.
- ❖ **Kolmer, J., Liu, J.Q., Sies, M. 1995.** Virulence and molecular polymorphisme in *Puccinia recondite f.sp. tritici* in Canada. *Phytopathology* 85: 276-285.
- ❖ **Kong, G. A., Kochman, G. K., Brown, J.F. 1990.** Effet of culture media and culture age on infection of sunflowers by *Alternaria helianthi* (Hansf) Tubaki and Nishihara. Proceedings of the Australian Sunflower .Association's 8th Workshop, Kooralbyn, Queensland. Pp: 135-140.
- ❖ **Kovachevski, I. C. 1936.** The blight of chickpea, *Mcosphaerella rabiei* n. sp. In the Review of *Applied Mycology*. The imperial Mycological Institute, Kew, Surrey : 700 (Abstract).
- ❖ **Kumari, S. G., Makkouk, K.H. M., Loh, H. M., Negassi, K., Tsegay, S., Kidane, R., Kibret. A. 1990.** Chickpea in Algeria. *In*: Saxena N.P., Saxena M.C., Jouhansen C., Virmani S.M. et Harris H. Adaptation of chickpea in West Asia and North Africa region. ICARDA- ICRISAT: 137-140.
- ❖ **Labdi M., 1990.** Contribution à l'étude de la variabilité d'isolats d' *Ascochyta rabiei*, agent de l'anthracnose du pois chiche en Algérie. Mémoire pour l'obtention de diplôme d'agronomie Approfondie. ENSA de Montpellier. 36 p.
- ❖ **Labdi, M. 1995.** Etude de la résistance à l'anthracnose (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.) chez le pois chiche (*Cicer arietinum* L.). Thèse de Doctorat de l'ENSA Montpellier, 155p.
- ❖ **Labdi, M., Bouznad, Z. et Corbière, R. 1998.** Effet de l'âge et du stade phénologique de la plante du pois chiche sur l'expression des symptômes de l'anthracnose. *In*: Labdi M., Maatougui M.E.H., Bouznad Z., Benabdeli K. et Benssedik B. Séminaire national sur les légumineuses alimentaires. 10-12 mai, Hammam Bouhdjer, Ain Temouchent : 173-181.
- ❖ **Labrousse, P. 1930.** L'anthracnose du Pois chiche (*Cicer arietinum*). *Rev. Patho. veg. Ent. agric.* 16.17:174-177p.
- ❖ **Labrousse, P. 1931.** Anthracnose of chickpea. *Review of Pathology and Vegetable*
- ❖ **Ladizinsky, G. 1975.** A new *Cicer* from Turkey. *Notes of the Royal Botanic Garden Edinburgh* 34: 201-202.

- ❖ **Ladizinsky, G. and Alder, H. 1975.** A new *Cicer* from Turkey. Notes of the Royal Botanic Garden Edinburgh 34: 201-202.
- ❖ **Ladizinsky, G. 1987.** Pulse domestication before cultivation. *Econ. Bot.*, 41: 60-65.
- ❖ **Ladizinsky, G. 1989.** Pulse domestication: Fact and Fiction. *Econ. Bot* 43: 131-133.
- ❖ **Lamour, K.H., Finley, L., Hurtado-Gonzales, O., Gobena, D., Tierney, M., et Meijer, H.J.G. 2006.** Targeted Gene Mutation in *Phytophthora spp.* MPMI Vol. 19, No.1, Pp. 1359–1367.
- ❖ **Latif, Z., Strange, R.N., Bilton, J. and Riazuddin, S. 1993.** Production of the phytotoxins, solanapyrones A and C and Cytochalasin D among nine isolates of *Ascochyta rabiei*. *Plant pathology*, 42: 172-180.
- ❖ **Latif, Z. 2002.** Role of virulence factors in breeding resistance to *Ascochyta rabiei*. Thèse de Doctorat (Ph. D.). University of Punjab, Lahore, Pakistan. 154p.
- ❖ **Laumont, P., et Chevassus, A. 1956.** Note sur l'amélioration du pois chiche en Algérie. Institut Agricole d'Algérie. Maison-carrée, Alger ; 24 p.
- ❖ **Le Driant. 2011.** Flore Alpesv & Pulsatille, eds. Frank LEDRIANT, Novembre 2011. [http// : www.floreAlpes.com/index.php](http://www.floreAlpes.com/index.php). (version 3.60, nov. 2011©).
- ❖ **Leach, M. 1962.** The quantitative and qualitative relationship ultraviolet and visible radiation to the induction of reproduction in *Ascochyta pisi*. *Can. J. Bot. Vol. II* : 19-50
- ❖ **Lee, J.H., Muhsin, M., Atienza, G.A., Kwak, D.Y., Kim, S.M., De Leon, T., Angeles, E.R., Coloquio, E., Kondoh, H., Satoh, K., Cabunagan, R.C., Cabauatan, P.Q., Kikuchi, S., Leung, H., Choi, R. 2010.** Single Nucleotide Polymorphisms in a Gene for Translation Initiation Factor (eIF4G) of Rice (*Oryza sativa*) Associated with Resistance to Rice *tungro spherical virus*. MPMI Vol. 23, No. 1,
- ❖ **Leisová, L., Hanzalová, A. and Kucera, L. 2008.** Genetic diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates as revealed by AFLP analysis. *J. Plant Pathol.*, 90, 233-245.
- ❖ **Lepoivre, P. 2003.** Phytopathologie. Ed. De Boeck, Les presses agronomiques de Gembloux, Belgique. p. 161-191.
- ❖ **Lourd, M. 1995.** Diversité génétique des populations de parasites des plantes: structure des populations et analyse de la diversité. ORSTOM, laboratoire de phytopathologie tropicale,
- ❖ **Maatougui, E.H, Bouznad, Z., Labdi, M. 1996.** Chickpea in Algeria. In : Adaptation of Chickpea in the West Asia and North Africa Region. (N P Saxena, M C Saxena, C Johansen, S M Virmani, and H Harris eds. INRAA & ICRISAT, 1996). pp.89-99.

- ❖ **Mabsoute, L., Meskine, M., Bouznad, Z. et Kharrat, M. 1996.** Résultats des surveillances sur les maladies cryptogamiques des principales légumineuses alimentaires dans le Maghreb. pp : 43-50. *In : Proceeding du symposium régional sur les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires*, 11-14 Novembre 1996, Rabat (Maroc). Projet Mghrébin PNUD/RAB/91/007.
- ❖ **Maden, S., Singh, D., Mather, S. B. et Neergard, P. 1975.** Detection and location of seed-born inoculum of *Ascochyta rabiei* and its transmission in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Seed Sci. And Technol.* **03** : 667-681.
- ❖ **MADR, 2016.** Annuaire statistiques du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural.
- ❖ **MADR, 2014.** Annuaire statistiques du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural.
- ❖ **Madrid, E., Bouhadida, M., Dolar, S., Kharrat, M., Houasli, C., Rubio, J. 2015.** Chickpea production in Mediterranean Basin. *Legume Perspectives* 10:5-7.
- ❖ **Mahiout, D., Bendahmane, B.S., Youcef Benkada, M., Martina, R. 2017.** Physiological Characterisation of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. Isolated from Diseased Chickpea Fields in Six Regions of Northwestern Algeria. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 15 (6): 1136-1146
- ❖ **Mahmood, T., Muhammad, S., Shinwari, Z.K. 2010.** Molecular and morphological characterization of *Caralluma* species. *Pak. J. Bot.*, 42(2): Pp 1163-1171.
- ❖ **Majer, D., Mitten, R., Lewis, B.G. Vos, P. And Olivier, R.P. 1996.** The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycol. Res.*, 100, 1107-1111.
- ❖ **Malhotra, R. S., Pundir, K. P. et Slinkard, A. E. 1987.** Genetic resources of chickpea. pp. 11-34 *In: Saxena H.C. and K.B Singh. (eds). The Chickpea* CAB International, Wallingford, U. K.
- ❖ **Malik, B.A, Tufail, M. 1981.** Chickpea production in Pakistan. *In Ascochyta blight and winter sowing of chickpeas. Proceeding of the workshop held in ICARDA*, 4-7 May, Aleppo, Syria. *Mediterr*, 47: 42–49.
- ❖ **Mani, A., and Sethy, C. L. 1984.** Plant growth of chickpea as influenced by initial inoculum levels of *Meloidogyne incognita*. *Indian Journal of Nematology*, 14:41- 44.
- ❖ **Mao, W., Lewis, A., Lumsden, R.D., Hebbar, K.P. 1998.** Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants. *Crop Prot.* 17, pp: 535-542.

- ❖ **Margalé, E., Chèvre, A.M., Delourme, R., Hervé, Y. 1994.** Description de la diversité génétique chez *Brassica oleracea* à l'aide de marqueurs iso-enzymatiques et moléculaires. Genet Sel Evol 26, Suppl1. Elsevier/INRA, 137s-183s.
- ❖ **Mazur, S., Nowrocki, J., Kucmeertz, J. 2004.** Disease symptoms on chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their causal agents. Folia Horticultrae Ann., 16: 47-53.
- ❖ **Mehrotra, R.S. 1983.** *Plant Pathology*. Tata McGraw Hill publishing company limited New Delhi:771p.
- ❖ **Mel'nik., V., Braun, V., Hagedorne, G. 2000.** Key to the fungi of genus, *Ascochyta* Lib (Coelomycètes), edition:Mitt. Bio,379p.
- ❖ **Merzoug, A., Ben Freha, F. et Taleb, M. 2009.** Les principales maladies fongiques du petit pois (*Pisum sativum*) et Pois chiche (*Cicer arietinum*) dans le nord ouest algérien. Colloque International : Gestion des risques phytosanitaires, Marrakech, Maroc.
- ❖ **Micales, J. A. et Bonde, M. R. 1995.** Isozymes: Methods and Applications. CRC Press, Inc. P18.
- ❖ **Milgroom, M. G. et Peever, T. L. 2003.** Population biology of plant pathogens. *Plant Disease* 87: 608 – 617.
- ❖ **Millan, T., Rubio, J., Iruela, M., Daly, K., Cubero, J.I., Gil, J. 2003.** Markers associated with ascochyta blight resistance in chickpea and their potential in marker-assisted selection. *Field Crops Research* 84: 373-384.
- ❖ **Morgante, M. And Olivieri, A.M. 1993.** PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.*, 3, 175-182.
- ❖ **Muehlbauer, F.J. and Rajesh, P. N. 2008.** Chickpea, a common source of protein and starch in the semi-arid tropics.PH Moore R Ming (eds.) Genomics of tropical crop plants.
- ❖ **Muehlbauer, F.J., Tullu, W.J. 1997.** Using host plant resistance to manage biotic stresses in cool season food legumes. *Euphytica* 73: 1-10.
- ❖ **MycoBank. 2016.** Sur le site [http://www.mycobank.org/name/Ascochyta rabiei](http://www.mycobank.org/name/Ascochyta_rabiei).
- ❖ **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. P19.
- ❖ **Namvar, A., Sharifi, R. S. 2011.** Phenological and morphological response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to symbiotic and mineral nitrogen fertilization. Journal Žemdirbystė (Agriculture) 2011 Vol. 98 No. 2 pp. 121-130.

- ❖ **Nasraoui, B. et Lepoivre, P. 2003.** Les champignons phytophagènes. In : De Boeck Université (eds.), *Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*.(pp.111-142). Bruxelles, Belgique.
- ❖ **Nasroui, B., 2008.** Principales maladies fongiques des céréales et légumineuses. 129, pp: 42-101.
- ❖ **Nautiyal, C.S., 2000.** Biocontrol of plant diseases for agricultural sustainability. In: Biocontrol potential and its exploration in sustainable agriculture. Upadhyay R.K., Mukherji K.G., Chamola B.P. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, USA. pp:9-23.
- ❖ **Navas-Cortés J.A., Pérez-Artés E., Jiménez-Díaz, R.M., Llobell, A., Brainbridge B.W., Heale, J.B. 1998.** Mating type, pathotype, and RAPDs analysis in *Didymella rabiei*, the agent of Ascochyta blight of chickpea. *Phytoparasitica* 26:199–212.
- ❖ **Navas-Cortés J., Pérez-Artés E. 1998.** Mating type, pathotype and RAPDs analysis in *Didymella rabiei*, the agent of ascochyta blight of chickpea. *Phytoparasitica* 26:199–212.
- ❖ **Nene, Y.L., Reddy, M.V., Haware, M.P. 1991.** Field Diagnosis of Chickpea Diseases and their Control. *Information Bulletin* No.28. India: International Crops Research Institute for the Semi- Arid Tropics. 52 pp.
- ❖ **Nene, Y.L., Reddy, M.V., Haware, M.P., Ghanekar A.M. 2012.** Field Diagnosis of Chickpea Diseases and their Control. *Information Bulletin* No. 28 (révisé). Patancheru, A.P. 502 324, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 60 pp.
- ❖ **Nene, Y.L., Reddy, M.V. 1987.** Chickpea diseases and their control. In 'The chickpea'. (Eds MC Saxena and KB Singh) pp. 233-270. (CAB International: Wallingford, UK).
- ❖ **Nene, Y.L., Sheila, V.K. 1992.** Important disease problems of kabuli chickpea. In Disease resistance breeding in chickpea'. (Eds KB Singh and MC Saxena) pp. 11-22. (ICARDA: Aleppo, Syria).
- ❖ **Nene, Y. L. 1981.** A review of Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.). In : Saxena, M. C. et Singh, K. B. Eds. Proceeding on workshop on Ascochyta blight and winter sowing chickpeas, 4-7 May 1981. Alep, Syrie. *ICARDA*, 17-33.
- ❖ **Nene, Y. L. 1984.** A review of Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Ascochyta blight and winter sowing of chickpeas. *ICARDA*, 17-35.
- ❖ **Nene, Y. L. et Reddy, M. V. 1987.** Chickpeas diseases and thier control. Gab international. Walling Food, 270- 273.

- ❖ **Nourollahi, K., Javannikkhah, M., Naghavi, M., Lichtenzweig, M.R., Okhovat, S.M. 2011.** Genetic diversity and population structure of *Ascochyta rabiei* from the western Iranian Ilam and Kermanshah provinces using MAT and SSR markers. *Mycological Progress* 10 (1):1-7.
- ❖ **Obanor, F.E., Walter, M., Jones, E.E., Jaspers, M.V. 2005.** *in vitro* effects of fungicides on conidium germination of *Spilocaea oleagina*, the cause of olive leaf spot. *New Zealand Plant Protection* 58: 278-282.
- ❖ **Ouédraogo, M., Maquet, A., Baudoin, J.P. 2005.** Étude comparative de la diversité et de la structure génétique de populations sauvages de *Phaseolus lunatus* L. à l'aide des marqueurs enzymatiques et microsatellites. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 9(3), Pp 195–205.
- ❖ **Ozkilinc, H., Frenkelb, O., Abbo, S., Eshed, R., Sherman, A., Shtienberg, D., Ophir, R., Can, C. 2010.** A comparative study of Turkish and Israeli populations of *Didymella rabiei*, the ascochyta blight pathogen of Chickpea. *Plant Pathology* 59: 492–503. doi: 10.1111/j.1365 3059. 2009.02226.x.
- ❖ **Ozkilinc, H., Frenkel, O., Shtienberg, D., Abbo, M. 2011.** Aggressiveness of eight *Didymella rabiei* isolates from domesticated and wild chickpea native to Turkey and Israel, a case study. *Eur. J. Plant Pathol* 131(3): 529-537.
- ❖ **Pacucci, G., Troccoli, C. and Leoni, B. 2006.** Supplementary irrigation on yield of chickpea genotypes in a mediterranean climate. International Commission of Agricultural Engineering. Commission internationale du Génie Rural (CIGR), *E Journal*. Manuscript LW 04 005. Vol. VIII.
- ❖ **Pande, S., Sharma, M., Gaur, P.M., Gowda, C.L.L. 2010.** Host Plant Resistance to Ascochyta Blight of Chickpea. Information Bulletin No. 82. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 40 pp. ISBN 978-92-9066-525-0. Order code: IBE 082.
- ❖ **Pande, S., Siddique, K.H.M., Kishore, G.K., Bayaa, B., Guar, P.M., Gowda, C.L.L., Bretag, T.W., Crouch, G.H. 2005.** Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review of biology, pathogenicity, and disease management. *Aust J Agric Res* 56:317–332.
- ❖ **Pandey, B. K., Singh, U. S. et Chaube, H. S. 1987.** Mode of infection of *Ascochyta* blight as caused by *Ascochyta rabiei*. *J. Phytopathol.* (Berlin) **119**: 88-93.
- ❖ **Patel, J. S., Meinhardt, S. W., Sierotzki, H., Stammler, G., Gudmestad, N. C., et Adhikari, T. B. 2011.** A two-step molecular detection method for *Pyrenophora tritici-repentis* isolates insensitive to QoI fungicides. *Plant Dis.* 95:Pp1558-1564.

- ❖ **Pearse, P., Mcvicar, R., Yasionowski, J. 2005.** Agriculture de Saskathewan et nourriture, p.200.
- ❖ **Peever, T.L, Salimath, S.S., Su, G., Kaiser, W.J., Muehlbauer, J. 2004.** Historical and contemporary multilocus population structure of *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) in the Pacific Northwest of the United States. *Mol Ecol* 13:291–309.
- ❖ **Phan, H.T.T., Ford, R., Taylor, P.W.J. 2003.** Mapping the mating type locus of *Ascochyta rabiei*, the causal agent of ascochyta blight of chickpea. *Mol Plant Pathol* 4:373–381.
- ❖ **Picot, A., Hourcade – Marcolla, D., Barreau, C., Pinson – Gadais, L., Caron, D., Richard – Forget, F., Lannou, C. 2012.** Interactions between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* in maize ears and consequences for fungal development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathology*, 61: 140 – 151.
- ❖ **Pieters, R., Tahiri, A. 1986.** Methods for screening resistance in chickpea to ascochyta blight. *Euphytica* 35: 1007-1010. Plant age and inoculum concentration on infection and development of *Ascochyta* blight of chickpea.
- ❖ **Pohronezny, K., Francis, J., Fong, W.G. 1987.** Strategies for chemical control of snap bean rust in Florida and their compatibility with canadian residue tolerances. *Plant Disease* 71: 639-642.
- ❖ **Pongam, P., Osborn, T.C. and Williams, P.H. 1999.** Assessment of genetic variation among *Leptosphaeria maculans* isolates using pathogenecity data and AFLP analysis. *Plant Dis.*, 83, 149-154. Polymorphism. *Euphytica* 88:181-188.
- ❖ **Porta-Puglia, A. 1990.** Status of *Ascochyta rabiei* of chickpea in the Mediterranean basin. *Options Méditerranéennes - Séries Séminaires* 9 : 51-54.
- ❖ **Punithalingam, E. et Hollyday, P. 1972.** *Ascochyta rabiei*. CMI (Commonw. Mycol. Inst.). *Descr. Pathog. Fungi & Bact.* 34: 337.
- ❖ **Quinn, A., Powell, C.C. 1982.** Effects of temperature, light and relative humidity on powdery mildew of begonia. *Phytopathology*. 72:480-484.
- ❖ **Rachwa-Rosiak, D., Nebesny, E., and Budryn, G. 2015.** "Chickpeas-composition, nutritional value, health benefits, application to bread and snacks: a review." *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 55(8), 1137-45.
- ❖ **Raju, S., Jayalakshmi, S.K., Sreeramulu, K. 2008.** Comparative study on the induction of defense related enzymes in two different cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes by salicylic acid, spermine and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Australian Journal of Crop Science*, 2(3): 121-140.

- ❖ **Raju, S., Jayalakshmi, S.K., Sreeramulu, K. 2009.** Differential elicitation of proteases and protease inhibitors in two different genotypes of chickpea by salicylic acid and spermine. *Journal of Plant Physiology*, 166:1015-1022.
- ❖ **Ramalho Ribiero, J.M.C., Portugal Malo, I.M. 1990.** Composition and nutritive value of chickpea *Options Méditerranéennes - séries séminaires*, 9:107-111.
- ❖ **Rapilly, F. 1968.** Mycology techniques in plant pathology. Ed. Ann. Epiphyt. 101p.
- ❖ **Redden, R.J. and Berger, J.D. 2007.** History and origin of chickpea. Chickpea breeding and management. *Pathol.*, 42: 172–180.
- ❖ **Reddy, M.V. 1987.** Control of seed-born diseases of chickpea and lentil. (Srivastava, J. for resistance to ascochyta blight. *Plant Disease* 68: 900-901.
- ❖ **Reddy, M. V. 1986.** Control of seed-born diseases of chickpea and lentil. (Srivastava, J. P. et Simarski, L. T. , Eds.). *Seed Production And Technology*, 207-218.
- ❖ **Reddy, M. V. et Kabbabeh, S. 1985.** Pathogen variability and race establishment in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. In Syria and Lebanon. *Phytopathol. Medi.* **24** : 265-266.
- ❖ **Reddy, M. V. et Singh, K. B. 1983.** Foliar application of Bravo 500® for *Ascochyta* blight control. *International chickpea Newsletter* 06: 18-19.
- ❖ **Reddy, M. V. et Singh, K. B. 1984.** Evaluation of a world collection of chickpea germplasm accessions for resistance to *Ascochyta* blight. *Plant Disease* 65: 586-587.
- ❖ **Regnault, J., P. 1990.** Microbiologie générale. Ed, Vigot. Paris et Décarie. Montréal, 844p.
- ❖ **Rhaïem, A., Chérif, M., Harrabi, M., Strange, R.N. 2006.** First report of *Didymella rabiei* on chickpea debris in Tunisia *Tunisian Journal of Plant Protection* 01 13-18.
- ❖ **Rouibah, M. 1989.** The contribution to the study of the wilting of the chickpeas in Algeria. Institut National Agronomique El- Harrach. Algérie, 51p.
- ❖ **Saiki, R. K., Faloona, F., Mullis, K. B. 1985.** Enzymatique amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354
- ❖ **Saikia, R., Singh, B.P., Kumar, R. and Arora, D.K. 2005.** Detection of pathogenesis-related proteins chitinase et -1,3-glucanase in induced chickpea. *CURRENT SCIENCE*, 89(4): 659-663.
- ❖ **Santra, D.K., Singh, G., Kaiser, W.J. 2001.** Molecular analysis of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., the pathogen of *Ascochyta* blight in chickpea. *Theoret Appl Gene* 102: 237-245.

- ❖ **Sarwar, N., Ashfaq, S., Akhtar, K.P., Jami, I F.F. 2013.** Biological Pathotyping and RADP Analysis of *Ascochyta rabiei*, From Various Chickpea Growing Areas of Pakistan. *J Anim Plant Sci* [en ligne], 23(3):882-887. <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-23-3/33.pdf>.
- ❖ **Saxena, M. C. 1992.** Current status and prospects of kabuli chickpea production. In: Disease Resistance Breeding in Chickpea international Centre for Agricultural Research in the Dry Areas. Aleppo, Syria. 185p.
- ❖ **Saxena, M.C. 1985.** Food legume improvement program at ICARDA, an overview. In: Faba Beans, Chickpeas and Lentils in the 1980s. M.C. Saxena and S. Varma (Editors), ICARDA, Aleppo, pages: 1-13.
- ❖ **Saxena, M.C. 1987.** Agronomy of chickpea. In: The Chickpea; M.C. Saxena and K.B. Singh (Editors), CAB International, Wallingford, pages: 207-232.
- ❖ **Saxena, M.C. 1990.** Problems and potential of chickpea production in the nineties. In: chickpea in the nineties (eds. van Rheenan, H.H. and Saxena M.C.). *Proc. 2nd Intl. Workshop on Chickpea Improvement*, pp. 13-25. International Crops Research Institute for the Semi- Arid Tropics (ICRISAT). Patancheru, Andhra Pradesh, India.
- ❖ **Saxena, N.C. 1984.** Chickpea. In: Goldsworthy P.R., Fisher N.M. *The Physiology of Tropical Field Crops*: 419-452.
- ❖ **Saxena, M. C. et Singh, K. B. 1991.** Eds. *Martinus Nijhoff / Dr. W. Junk Publishers of ICARDA, The Hague, The Netherlands*: 229-235.
- ❖ **Sayoud, R., Bouznad, Z. et Ezzahiri, B. 1999.** Les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires au Maghreb. ITGC, Algérie; 64 p.
- ❖ **Schnieder, F., Koch, G., Jung, C., Verret, J.A. 1998.** The application of molecular markers for genetic characterization of *Septoria tritici* population. *J. Plant Dis. Protect.*, 105 (5), 452-461.
- ❖ **Schwinghamer, M.W., Larsen, R.C. 2011.** Viruses reported to infect chickpea and/or lentil naturally. In: Chen W, Sharma HC, Muehlbauer FJ (eds) *Compendium of chickpea and lentil diseases and pests*. APS Press, St. Paul, MN, USA, pp 73–76.
- ❖ **Setti, B., Bencheikh, M., Henni, D.E. Claire, N. 2011.** Advances of Molecular Markers Application in Plant Pathology Research. *European Journal of Scientific Research*. Vol.50 No.1, Pp.110-123.
- ❖ **Sharma, M., Ghosh, R. 2016.** An Update Genetic Resistance of Chickpea to *Ascochyta* blight Agronomy, en ligne, 6(18):1-15, (page consulté le 7 novembre 2016 par Mahiout). [Thttp:// oar.icrisat.org/93788/1/agronomy-06-00018.pdf](http://oar.icrisat.org/93788/1/agronomy-06-00018.pdf)8T.

- ❖ **Shroeder, B.K. 2011.** Diseases caused by bacteria and phytoplasma. In: Chen W, Sharma HC, Muehlbauer FJ (eds). Compendium of chickpea and lentil diseases and pests. APS Press, St. Paul, MN, USA, pp 92-94.
- ❖ **Sidique, K.H.M. and Bultynck, L. 2004.** Agronomy. In: Wrigley C., Corke H. and Walker C. (Eds.), Encyclopedia of Grain Science. Academic Publishers, United Kingdom: 287-295.
- ❖ **Singh, K. B., Reddy, M. V. and Mehrotra, R. S. 1987.** Chickpea breeding. In: Saxena M. C. and Singh K. B. (eds) the chickpea. CAB International Publisher, UK, pp127-162.
- ❖ **Singh, K.B. 1984.** Chickpea breeding.. In: Saxena, M. C. et Singh, K. B. Eds. The chickpea. CAB International, U. K. P. 127-162.
- ❖ **Singh, K.B. 1990.** Status of chickpea in the world. *International chickpea Newsletter* 22: 10 16.
- ❖ **Singh, K.B, and Reddy, M.V. 1984.** International testing of chickpeas for resistance to ascochyta blight. *Plant Disease* 68: 782-784.
- ❖ **Singh, K.B, Malhotra, R.S, Halila, M.H., Knights, E.J., Verma, M.M. 1994.** Current status and future strategy in breeding chickpea for resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica* 73, 137 49.
- ❖ **Singh, K.B, Reddy, M.V. 1990.** Patterns of resistance and susceptibility to races of *Ascochyta rabiei* among germplasm accessions and breeding lines of chickpea. *Plant Disease* 74: 127-129.
- ❖ **Singh, K.B., Reddy, M.V., Haware, M.P. 1992.** Breeding for resistance to ascochyta blight in chickpea. In: Disease resistance in chickpea, (Singh K.B. and M.C. Saxena eds.). ICARDA, Aleppo, Syria, pp. 23-54
- ❖ **Singh, K.B., Saxena, M.C., Agridley, H.E. 1983.** Screening chickpea for cold tolerance and frost resistance. In: Workshop on *Ascochyta* blight and winter sowing of chickpea. ICARDA, Alep, Syrie.
- ❖ **Singh, O. V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., Jain, R. K. 2003.** Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 405-412.
- ❖ **Singh, P. J., Mehrotra, R. S. 1980.** Biological control of *Rhizoctonia bataticola* on gram by coating seed with *Bacillus* and *Streptomyces* spp. and their influence on plant growth. *Plant and soil*, **56**:475-483.

- ❖ **Singh, P.K. 2001.** Genetic studies on the resistance to tan spot of wheat and genetic similarity among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. PhD thesis, University of Saskatchewan, Canada.
- ❖ **Singh, P.K. and Hughes, G.R. 2006.** Genetic similarity among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. *J. Phytopathol.*, 154, 178-184.
- ❖ **Singh, K. B., Ocampo, B. and Robertson, L. D. 1998.** Diversity for abiotic and biotic stress. *Ressources and Crop Evolution.*, 45 : 9 – 17.
- ❖ **Singh, K. B. et Reddy, M. V. 1990.** Patterns of resistance and susceptibility to races of *Ascochyta rabiei* among germplasm accessions and breeding lines of chickpea. *Plant Disease* 4: 127-129.
- ❖ **Singh, K. B., Hawtin, G. L., Nene, Y. L., Reddy, M. V. 1981.** Resistance in chickpea *Ascochyta* blight. *Plant Disease* 65 : 586-587.
- ❖ **Singh, K. B., Reddy, M. V. et Nene, Y. L. 1984.** International testing of chickpeas for resistance to *Ascochyta* blight. *Plant Disease* 68: 782-784.
- ❖ **Singh, P. J., Mehrotra, R.S. 1980.** Biological control of *Rhizoctonia bataticola* on gram by coating seeds with *Bacillus* and *Streptomyces spp.* and their influence on plant growth. *Plant and soil*. 46:310-321.
- ❖ **Slama, F. 1998.** Cultures industrielles et légumineuses à graines. Ed. Centre de diffusion Universitaire Tunisie, en Arabe ; 300 p.
- ❖ **Smith, T. L. 1919.** Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *New Eng. Journal of Mediterranean*. 340: 493- 501.
- ❖ **Soltani, A., Hammer, L., Torabi, B., Robertson, M.J., Zeinali, E., 2006.** Modeling chickpea growth and development: Phenological development. *Field Crops Research*, 99:1-13.
- ❖ **Southern, E.M. 1979.** Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods enzymol.*, 68, 152-76.
- ❖ **Steinberg, S.A., Arambarri, A.M., Sevillano, M.D., Balatti, P.A. 2005.** Leaf epidermal characters related with plant's passive resistance to pathogens vary among accessions of wild beans *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* (Leguminosae-Phaseoleae). *Flora* 200: 285-295.
- ❖ **Stukenbrock, E.H., Banke, S. and McDonald, B.A. 2006.** Global migration patterns in the fungal wheat pathogen *Phaeosphaeria nodorum*. *Mol. Ecol.*, 10, 1-10.

- ❖ **Susanne, D., Wolfgang, B. 1990.** Elicitor- induced metabolic changes in cell cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.) Cultivars resistant and susceptible to *Ascochyta rabiei*. *Planta*, 182:279- 286.
- ❖ **Tadashi, K. 1988.** Sppressive effect of preirradication with blue light on near ultraviolet light induced conidiation in *Alternaria tomato*. *Can.J. Bot.*64: 896-899.
- ❖ **Tagu, D., Moussard, C., 2003.** Principes des techniques de biologie moléculaire, INRA Editions, Mieux comprendre, INRA, Paris.
- ❖ **Tenhaken, R. 1992.** Virulenzfaktoren phytopathogener pilze biochemische und molecular biologische unter suchungen zur infektion der kichererbse duech *Ascochyta rabiei*. Dissertation, Univ. Münster, Münster, Allemagne.
- ❖ **Tivoli, B., Halila, H. et Porta-Puglia, A. 1998.** Les anthracnoses des légumineuses à grosses graines dans les pays du pourtour méditerranéen. **In** : les légumineuses alimentaires méditerranéennes. Ed. INRA, Paris (les Colloques, n°88). 2e séminaire GRAM : 80-97.
- ❖ **Tlemsani, M. 2010.** Contribution à l'étude du flétrissement vasculaire du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) causé par *Fusarium oxysporum* Schelcht. Emend. Snyd. & Hans. *f.sp. ciceri* (Padwick) : caractérisation, lutte biologique et comportement variétal. Thèse magister en Biotechnologie. Univ d'Oran. 169p.
- ❖ **Trapero-Casas, A. 1983.** Wilt and root rot of chickpea in the Guadalquivir valley: importance, distribution, etiology, epidemiology and control. Ph. D. Thesis, University Cordoba ; 295 p.
- ❖ **Trapero-Casas, A., Jiménez-Díaz, R.M. 1985.** Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. *Phytopathology* 75:1146–51.
- ❖ **Trapero-Casas, A. et Kaiser, W. J. 1992a.** Development of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea straw. *Phytopathology* **82**: 1261-1266.
- ❖ **Trapero-Casas, A. et Kaiser, W. J. 1992 b.** Influence of temperature, wetness period, plant age and inoculation concentration on infection and development of *Ascochyta* blight of chickpea. *Phytopathology* **82**: 589-596.
- ❖ **Trapero-Casas, A., Navas-Cortés, J. A. et Jimenez-Diaz, R. M. 1996.** Airborne ascospores of *Didymella rabiei* as a major primary inoculum for *Ascochyta* blight epidemics in chickpea crops in Southern Spain. *European J. Plant Pathol.* 02: 237-245.
- ❖ **Traperos-casas, A., Kaiser, W.J., Ingram, D.M. 1990.** Control of Pythium Seed Rot and Preemergence Damping-off in the U.S. Pacific Northwest and Spain. *Plant Disease* 78(8): 563-569.

- ❖ **Tripathi, H.S., Singh, R.S., Chaube, H.S. 1987.** Effect of fungicidal seed and foliar application on chickpea *Ascochyta* blight. *Indian Phytopathology* 40 (1) : 63-66.
- ❖ **Türkkan, M., Dolar, F.S. 2009.** Determination of pathogenic variability of *Didymella rabiei*, the agent of ascochyta blight of chickpea in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 33: 585-591. doi: 10.3906/tar-0901-34
- ❖ **Udupa, S. M., Weigand, F., Vir, S. et Grewal, J. S. et Kahl, G. 1998.** Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the *Ascochyta* blight pathogen of chickpea. *Theor. Appl. Genet.* **97**: 299-307.
- ❖ **Udupa, S.M., Weigand, F. 1997.** Pathotyping of *Ascochyta rabiei* isolates of Syria. DNA markers and breeding for resistance to ascochyta blight in chickpea. In: *Proceedings of The Symposium on "Application of DNA Fingerprinting for Crop Improvement: Marker Assisted Selection of Chickpea for Sustainable Agriculture in The Dry Areas* (Udupa S. M. et Weigand F. eds.). ICARDA, 11-12 April 1994, Aleppo, Syria.
- ❖ **Unartngam, J., Janruang, P., To-anan, C. 2011.** Genetic diversity of *Puccinia polysora* in Thailand based on inters simple sequence repeat (ISSR) markers analysis. *Journal of Agricultural Technology* 7(4):Pp1125-1137.
- ❖ **Upadhyaya, H.D., Thudi, M., Dronavalli, N., Gujaria, N., Singh, S., Sharma, S., Varshney, R.K. 2001.** Genomic tools and germplasm diversity for chickpea improvement. *Plant Genetic Resources – Characterization and utilization* 9 (1). pp. 45-58. doi.org/ 10.1017 /S1479262110000468.
- ❖ **USDA. 2016.** United States Departement of Agriculture.à l'aide de site: <https://plants.usda.gov/java/CassificationServlet?source=profile&symbol=CIAR5&display=31>.
- ❖ **Vail, S, Banniza, S. 2008.** Molecular variability and mating-type of *Ascochyta rabiei* of chickpea from Saskatchewan, Canada. *Australas Plant Pathol* 38:392–398.
- ❖ **Vail, S.L. 2005.** Population studies of *Ascochyta rabiei* on Chickpea in Saskatchewan. Thesis of Master of Science. University of Saskatchewan Saskatoon.
- ❖ **Vakalounakis, D.J. and Fragkiadakis, G.A.1999.** Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: Differentiation by pathogenicity vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. *Phytophology*, 89, 161-168.
- ❖ **Van der Maesen, L.J.G. 1972.** 'Cicer L., A Monograph of the Genus with Special Reference to Chickpea (*Cicer arietinum* L.), its Ecology and Cultivation.' (Mededelingen Landbouwhoge School: Wageningen).
- ❖ **Van Der Maesen, L.J.G. 1987.** Origin, history and taxonomy of chickpea. p. 11-34. In: Saxena, M. C. & Singh, K. B. Eds. *The chickpea* CAB International, Wallingford, U. K.

- ❖ **Van Der Maesen, L.J.G. 1984.** Availability and use of wild *Cicer* germplasm. *Plant Genet. Newsletters* 57: 19-24.
- ❖ **Van der Maessen, G. 1979.** Genetic resources at ICRISAT; Chickpea Newsletter (1): 2 p.
- ❖ **Verghis, T.I., McKenzie, B.A. et Hill, G.D. 1999.** Phenological development of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Canterbury, New Zealand. *New Zealand Journal of crop and Horticultural Science*; 27: 249-256.
- ❖ **Verscheure, M., Lognay, G. et Marlier, M. 2002.** Revue bibliographique : les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. *B.A.S.E*, 6, 131-142.
- ❖ **Vignal, A., Milan, D., Sancristobal, Eggen, A. 2002.** A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* 34 : Pp 275-305
- ❖ **Voge, G. 2008.** Analyse d'images avec ImageJ. Stage TICE d' Isle-d'Abeau. P9.
- ❖ **Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23, 4407-4414.
- ❖ **Weigand, F., Köster, J., Wieltzien, H. C. et Barz, W. 1986.** Accumulation of phytoalexins and isoflavone glucosides in a resistant and a susceptible cultivar of *Cicer arietinum* during infection with *Ascochyta rabiei*. *J. Phytopathol.* (Berlin) **115**: 214 – 221.
- ❖ **Weiland, J.J., SteVenson, B.J., Cartwright, R.D., Webster, R.K. 1999.** Identification of molecular genetic markers in *Pyrenophora teres f. teres* associated with low virulence on 'Harbin' barley. *Phytopathology* , 89, 176– 181.
- ❖ **Weitz, H.G., Köhler, W. and Leonard, K. 1993.** Isozyme variation within and among pathogenic races of *Cochliobolus carbonum* on Corn in North California. *Molecular Ecology. Phytophathology*, 84, 31-38.
- ❖ **Weltzien, H.C. and Kaack, H.J. 1984.** Epidemiological aspects of chickpea *Ascochyta* blight. *In* Saxena M.C. and Singh K.B. *Ascochyta Blight and Winter Sowing of Chickpeas*. Ed. Martinus Nijhoff / Dr W. Junk. Publishers: 35-44.
- ❖ **Wery, J. 1990.** Adaptation to frost and drought stress in chickpea and implications in plant breeding. *In*: Saxena M.C; Cubero J.J. et Wery (Eds). *Present status and future prospects of chickpeas. Crop production and improvement in the Mediterranean countries. Phytochem.* **28**: 2627-2630.
- ❖ **Westman, A.L. et Kresovich, S. 1999.** Simple sequence repeats (SSR)-based marker variation in *Brassica nigra* genebank accessions and weeds populations. *Euphytica*. 109: Pp 85-92.

- ❖ **White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W., 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J. Sninsky & T.J. White (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and amplifications* (pp. 315-322). New York, NY, USA. Academic Press.
- ❖ **Wielozien, H. C. et Kaack, H. J. 1981.** Epidemiological aspects of chickpea *Ascochyta blight*. In : *Ascochyta blight* and winter sowing of chickpeas. ICARDA, 4-7 May 1982. Saxena, M. C. et Singh, K. B. Eds. The Hague, The Netherlands : *Martinus Nijhoff / Dr Junk Publ.* p. 35-40.
- ❖ **Wiese, M. V., Kaiser, W. J., Smith, L. J. et Muehlbauer, F. J. 1995.** *Ascochyta rabiei* of chickpea. Ed. AG. Communication Center. Univ. De Idaho. Moscow, Russie. 4p.
- ❖ **Williams, J.G.K., Kubelki, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531-6535.
- ❖ **Wilson, A. et Kaiser, W. J. 1995.** Cytology and genetics of sexual incompatibility in *Didymella rabiei*. *Mycologia* **87**: 795-804.
- ❖ **Wise, K.A., Bradley, C.A., Markell, S., Pasche, J. 2011.** Sensitivity of *Ascochyta rabiei* populations to prothioconazole and thiabendazole. *Crop Protection* **30**: 1000-1005.
- ❖ **Xu, J. 2010.** Fundamentals of Fungal Molecular Population Genetic Analysis. *Curr. Issues Mol.*, 8, 75-90.
- ❖ **Xu, J. 2001.** PCR restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses reveal both extensive clonality and local genetic differences in *Candida albicans*. *Mol. Ecol.*, 8, 59-73.
- ❖ **Xu, J., Mitchell, T.G., and Vilgalys, R.J. 1999.** PCR restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses reveal both extensive clonality and local genetic differences in *Candida albicans*. *Mol. Ecol.*, 8, 59-73.
- ❖ **Zaatri, M. 1987.** Contribution à l'étude de l'anthracnose de pois chiche, Aspects de la résistance et races physiologiques. Thèse d'Ing. En agronomie. INA.El- Hrrach. Alger. 49p.
- ❖ **Zachos, D.G., Panagopoulos, C.G., Makris, S.A. 1963.** Researchs on the biology, epidemiology and the control of anthracnose of chickpea. *Ann. Inst. Phytopathol. Benaki*, N. S. 05 : 167-192.
- ❖ **Zaim, S. 2007.** Contribution à l'étude de *Trichoderma spp.* Agent antagoniste de *Fusarium oxysporum* f. spp. *ciceri* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, agent du

- flétrissement vasculaire du pois chiche et de la lentille. Mémoire de Magister, Université de Mascara., 113pp.
- ❖ **Zerrouk, M.M. 1994.** Study of some biological and physiological aspects of the fungus *Ascochyta rabiei* (Pss). Lab. Causal agent of chickpea anthracnose (*Cicer arietinum* L.). Magister's dissertation in Microbiology. University of Setif Algeria.
 - ❖ **Zhan, J.,Torriani, S.F.F., McDonald, B. A. 2007.** Significant difference in pathogenicity between MAT1-1 and MAT1-2 isolates in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet Biol* 44:339–346.
 - ❖ **Zhang, J. X., Fernando, X. G. D., and Remphery, W. R. 2005.** Molecular detection of *Apiosporina morbosae*, causal agent of black knot in *Prunus virginiana*. *Plant Dis.* 89:815-821.
 - ❖ **Zikara- Zine, F. 2003.** Etude des groups de conjugaison de 15 isolats algériens de *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. Pour la reproduction sexuée (ou la forme parfaite). Analyse de la variabilité pathogénique de leurs descendants. Thèse de Magister INA El Harrach Alger, 71p.
 - ❖ **Zikara-Zine, F., Bouznad, Z. 2007.** Virulence et groupes de compatibilité dans les isolats d'*Ascochyta rabiei* en Algérie. *INRA Algérie - Recherche Agronomique* 19 : 48 – 55.
 - ❖ **Zine-Zikara, F., Bouzid, L., Yekkour, A. 2015.** Le pois chiche en Algérie : situation, potentialités et perspectives. *Recherche Agronomique* 27: 35-47.

Annexes

Partie II: Etude expérimentale

Chapitre III : Matériel et Méthodes

Annexe 01: La composition du milieu de culture CSMDA

Le milieu de culture utilisé: CSMDA (Chickpea Seed-Meal Dextrose Agar), sa composition est la suivante :

- Pois chiche.....200g.
- Glucose.....15g.
- Gélose (Agar Agar).....20g.
- pH.....5,5 à 5.8.
- Eau distillée.....1000 ml.

Annexe 02 : Préparation de la suspension des spores

1-Comptage des spores:

Le comptage se fait au microscope à l'aide de la cellule de numération de *Malassez*. Le comptage se fait suivant la diagonal. Si le comptage est en dessous de 6 spores par carreau, on compte les 25 carreaux. Un carreau est compté de 16 petits carreaux, délimités par trois (03) traits (type sans rebords) ou par deux (02) traits (type avec rebords). Les spores contenues dans un carreau constituent un comptage. Il faut compter les spores dans la partie ombragée, le côté en haut à gauche puis lire ensuite les carreaux vers le bas (Fig.68). Les spores qui sont sur la ligne sont comptées si plus que la moitié est dedans et non comptées, si moins dans le cas contraire.

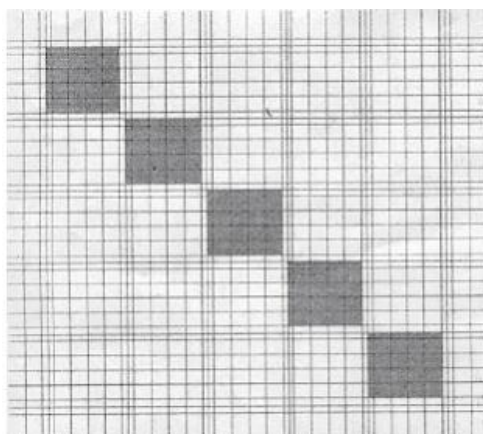


Figure 68 : Observation microscopique sur la cellule de *Malassez* (x10)

2- Calcul de la concentration:

Après avoir fait les comptages des 5 carreaux de chaque coté de la lame, on effectue leur somme puis on multiplie par cinq pour avoir le total sur 25 carreaux. Ensuite on calcule la moyenne des sommes pour les deux différents côtés. Soient a et b, les différentes sommes :

$$X = \frac{a + b}{2}$$

X : Comptage moyen de 25 carreaux (comptage pour 5 carreaux multiplié par 5), alors pour trouver la concentration par ml de la dilution utilisée, il faudra faire :

$$X \times 10^4 = C \text{ spores/ml}$$

Si « **n** » est le nombre de fois dilué, alors la concentration de spores dans la solution originale sera égale à :

$$C_1 \times 10^n = C \text{ spores / ml}$$

Sachant que :

N : Nombre de dilutions

C₁ : Solution diluée

C : Solution originale

Pour notre expérience, on a utilisé la concentration 10 spores/ml. Pour obtenir cette concentration, il faut trouver 10 spores par 25 carreaux (x =10).

Annexe 03 : Composition des milieux de culture

Tous les milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes sous une pression de 1bar.

1-Le milieu pois chiche CSMDA (Annexe 01)

2-Le milieu PDA (g/l) (Potato Dextrose Agar)

Composition : pour un volume de 1000 ml, le milieu PDA est constitué des ingrédients suivant :

- Pomme de terre.....200g.
- Glucose.....20g.
- Gélose (Agar Agar).....20g.
- pH.....5,5 à 5.8.
- Eau distillée q.s.p.....1000 ml.

3- Le milieu Sabouraud- gélosé

Composition : Il s'agit d'un milieu couramment utilisé pour la numération et la culture des

champignons. Ce milieu est composé de :

- Glucose.....30g
- Peptone.....10g
- Gélose (Agar Agar).....20g
- pH.....5,5 à 5.8.
- Eau distillée q.s.p.....1000 ml

Préparation : concernant ce milieu, nous l'avons utilisé sous une forme prête à couler après fonte.

4- Milieu Malt- agar:

- Extrait de Malt.....20g
- Glucose.....20g
- Peptone.....1g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,23g
- Gélose (Agar Agar).....20g
- pH.....5,5 à 5,8.
- Eau distillée q.s.p.....1000ml

Annexe 04 : L'estimation des dimensions de la longueur et de la largeur des pycnidiospores de *A.rabiei*

L'estimation des dimensions de la longueur et de la largeur des pycnidiospores de *A.rabiei* est réalisée ; cette mensuration est effectuée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (Fig.69).

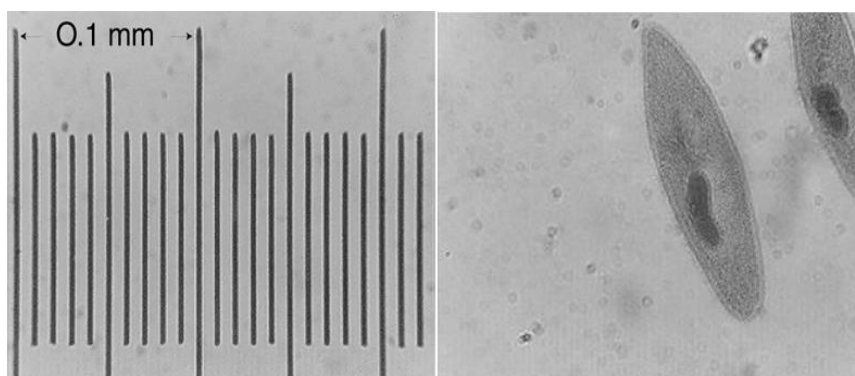


Figure 69. Technique d'estimation des dimensions de la longueur et de la largeur des pycnidiospores de *A.rabiei*.

Annexe 05 : Les amorces spécifiques utilisées en PCR multiplex

Amorces	Séquences 5'-3'
SP21F	ACAGTGAGCCTGCACAGTTC
Tail5F	CGCTATTTTATCCAAGACACACC
Com1R	GCATGCCATATCGCCAGT

Annexe 06 : Amplification PCR multiplex MAT (Mixture PCR)

		Volume µl
Tanpon Taq polymerase Promega	5X	5
Mg Cl2	25 Mm	2,5
dNTP	25 Mm	0,2
SP21F	10 µM	1
Tail5F	10 µM	1
Com1R	10 µM	1
Taq Hot start Promega	5U/µl	0,3
Eau ultra pure		12
DNA		2
Volume Finale		25

Annexe 07 : Programme température de la PCR

95°C :	12min	
95°C:	30 s	
58	45Ns	45 Cycles
72°:	1min	
72°C:	5min	
4°C:	jusqu'à révélation	

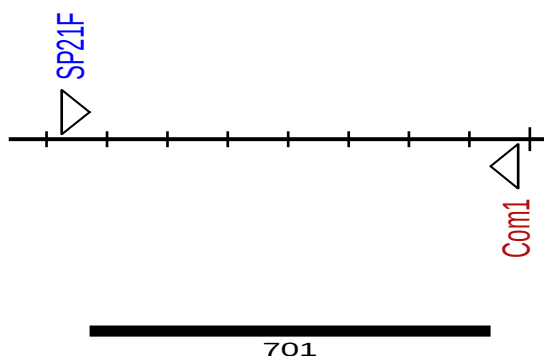
Annexe 08 : Vérification des tailles des fragments MAT.

1-Fragment amplifié de longueur 701 pb

» (amorce: SP21F) — 663 pb — (amorce: Com1 R) « Q = 663.0 (d'accord l'amplification)

Séquence amplifiée :

ACAGTGAGCCTGCACAGTTCTACGATGACCTTGCTGATTTTTTGATCAACAATGTTGGACA
 GACCAGCAGGCTCATACTAGCGCTACTACCGCGCTCGCTGTAGCTGGAGATCCCAGATAC
 CAGGCTGGACAGACTGACCGCGTTTCGACTCGGCGCAGACGAAATGCACACTACCTAGTT
 TCGACCTGCATTGCTATGATTAGCTTTCACAACTCGCATTCAAGGATTCACAGATCTCTAT
 AACTCACCGAACCCTTTCTCCGACCTTTTTCGCACGCATCTACCTGCTGGCGATTTTTGTG
 GATCTTTTCTTGTACTGCACGTACTGATCTTGTATCATCTTCACTCGATACCCCTGTCAAA
 CACGCTTTTCTCGCGTTTGTACATCATTTTCCACGTCGGTAGCTATTCTGGAGCTTCCGCG
 GTATTGCAGCGACTTTTTGTGACTACGACACCATCACGCCAACGATCCACTTGGGCACAA
 CACCCCAGACGCTATTCTCTTTCGGTTTCTTTATTCTTAAAAGAAGTTTTGGGACATCAAG
 GCATCGACGAAGTGTCCAGGAACCATGTGTACCCGACCAAATCGTGACTTGAAGACAC
 GTTCAGCCACTCCGTATTGATGAGCACACGAACATGTGTCTTCAAAGCTTGCAACCAGGC
 ACTGGCGATATGCATGC

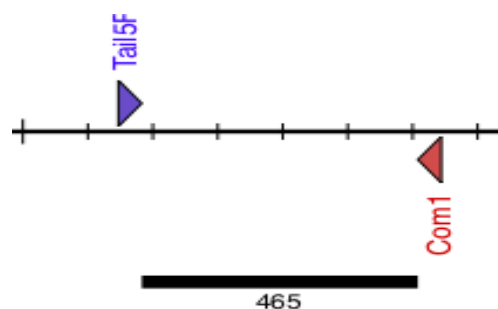


2- Fragment amplifié de longueur 465 pb

» (amorce: Tail5F) — 424 pb — (amorce: Com1 R) « Q = 424.0 (d'accord l'amplification)

Séquence amplifiée :

CGCTATTTTATCCAAGACACACCATTTGCGATACGCACTTTGAGATTTGGTCTTGTCTCCTCCT
 ACTACCAGCATCTGCGCAGGGTGTTTCGTTCGATTCTTTGTTGCAGCGCAACCCCGGTCGAT
 GGCGTCCTCGTTTCTCGGACACCCAAGAGGTCTCTGGAATTCTGCTTGACGGTCGTCGCCC
 TCTGCCTCTCCTCCATAAACGGAAGCCTCAGTGTTTCAGATGATCAAGGCTGACTTCAATG
 ATACCCAATGCTCATTTTTTCTATTTTTCGTTGCTTCATCACACTCATTGATTTTCTATGAC
 TGCGCCACGTCATGGAAATCAAGCCCGTCTCCACTCTGAGACGCTTTTCATGTTTCGGTCG
 CGACTGCAGTCGTTTGTACATGCGCGGATGCTGGAAAGTCGTCGGGTCAGGAAGTTCTTG
 CTTACAGCTGTTAGCACTTAGGCACTGGCGATATGGCATGC



Chapitre IV : Résultats et Discussion

Annexe 9: Incidence moyenne de l'antracnose du pois chiche (en %) durant la campagne agricole 2015/2016

Régions	Lieux-dits	Incidence moyenne en %	Moyenne régionale en %
Mascara	Maoussa	52,4	46 ,68 %
	Teghennif	45,66	
	Sidi kada	42	
Sidi Bel Abbès	Tassala	41	38,5 %
	Sidi Lahcene	45	
	Attouche	37	
	INRASBA	31	
Relizane	Mendes	32	26.5 %
	Yellel	27	
	Beni Dergane	20,5	
Mostaganem	Sidi Ali	20,33	18.67 %
	Sidi Lakhdar	18,5	
	Achacha	17,2	
Ain Témouchent	Hassi El Ghala	15,7	13.63 %
	Beni Saf	14,8	
	Kihal	10,4	
IM en %		29.40	

IM : Incidence moyenne de la maladie en %.

Annexe 10 : La sévérité de la maladie moyenne durant la campagne agricole 2015/2016

Régions	Lieux-dits	Sévérité de la maladie	Moyenne régionale en %
Mascara	Maoussa	4.2	4.66
	Teghennif	4.9	
	Sidi kada	4.9	
Sidi Bel Abbès	Tassala	3	3.3
	Sidi Lahcene	3	
	Attouche	3,6	
	INRASBA	3,6	
Relizane	Mendes	1.5	1.5
	Yellel	1.5	
	Beni Dergane	1.5	
Mostaganem	Sidi Ali	2	2.16
	Sidi Lakhdar	2,5	
	Achacha	2	
Ain Témouchent	Hassi El Ghala	2	2.33
	Beni Saf	2.5	
	Kihal	2,5	
Sévérité moyenne		4.10	

Annexe 11 : Croissance mycélienne, sporulation et la taille des conidies des isolats de *A.rabiei*

1-Croissance mycélienne journalière (en mm) des isolats de *A .rabiei*, 15 jours après leur culture sur milieu de culture CSM DA. pH=5.8

Isolats	Jours														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
MSC1	0	0	1,00	,225	2,85	3,35	,325	5,65	6,35	8,35	,925	11,00	,1125	13,00	13,21
MSC2	0	0	,125	1,65	2,35	4,35	5,35	7,25	8,00	8,25	,925	10,25	13,50	14,25	15,18
MSC3	0	0	,145	,255	,355	5,00	6,15	,725	,850	10,50	11,50	12,00	12,25	12,55	12,55
AT1	0	0	0,85	2,25	3,35	4,35	5,55	6,35	7,50	8,35	10,55	11,15	13,15	14,25	,1507
AT2	0	0	1,85	3,35	4,50	5,55	6,00	,685	10,85	12,83	,1455	15,16	15,55	16,25	16,25
AT3	0	0	0,65	1,16	2,65	3,50	,425	4,50	,585	6,25	6,85	8,50	9,55	10,55	11,33
SB1	0	0	1,35	2,55	3,50	4,66	5,66	6,25	,700	8,25	9,05	10,55	12,33	13,85	14,86
SB2	0	0	2,50	3,55	4,25	6,65	7,35	9,35	,1055	13,00	14,25	14,55	15,66	16,26	16,26
SB3	0	0	1,33	2,15	2,65	3,00	3,16	5,00	,633	7,15	,985	11,66	12,55	13,83	14,20
SB4	0	0	1,83	2,25	3,85	4,66	6,85	7,33	8,33	9,85	11,65	12,25	13,33	14,66	15,20
MOS1	0	0	,233	3,85	4,66	6,66	8,33	9,85	11,66	12,85	13,66	14,16	15,25	16,66	17,04
MOS2	0	0	1,33	3,25	4,33	6,05	7,33	9,55	11,85	13,55	14,85	16,66	18,55	19,33	20,01
MOS3	0	0	0,85	1,05	2,66	3,85	5,15	7,16	8,66	10,00	11,55	13,25	14,16	14,83	15,50
REL1	0	0	1,85	3,55	4,66	5,66	8,35	9,66	11,83	12,85	14,66	15,16	16,25	17,66	18,76
REL2	0	0	,100	,205	2,65	3,66	4,33	5,25	,683	7,25	,983	11,16	12,33	13,83	14,50
REL3	0	0	,133	,216	,333	4,16	5,15	6,25	7,35	8,33	9,50	10,00	11,25	12,00	12,25

2-Sporulation et la taille des pycnidiospores des isolats de *Ascochyta rabiei*. 15 jours après leur culture sur milieu CSMDA, pH = 5,8

Isolats	Sporulation (spores/ml)	Taille des conidies (µm)	
		Largeur moyenne	Longueur moyenne
MSC1	4 .10 ⁵	5,45	12,45
	5.10 ⁵	4,45	11,45
	3.10 ⁵	6,45	13,45
MSC2	4,5.10 ⁵	4,72	14,25
	5,5.10 ⁵	5,72	14,25
	3,5.10 ⁵	3,72	14,25
MSC3	5.10 ⁵	7,55	15,55
	5.10 ⁵	6,55	16,55
	5.10 ⁵	8,55	14,55
AT1	5 ,25.10 ⁵	5,25	12,23
	4 ,25.10 ⁵	6,25	13,23
	6 ,25.10 ⁵	4,25	11,23
AT2	5 ,25.10 ⁵	5,25	14,23
	6 ,25.10 ⁵	5,25	14,23
	4 ,25.10 ⁵	5,25	14,23
AT3	5 ,5.10 ⁵	5,25	15,25
	6 ,5.10 ⁵	6,25	15,25
	4 ,5.10 ⁵	4,25	15,25
SB1	2,25.10 ⁵	5,33	14,15
	1 ,25.10 ⁵	5,33	16,15
	3 ,25.10 ⁵	5,33	12,15
SB2	7,25.10 ⁵	6,25	14,34
	6 ,25.10 ⁵	4,25	13,34
	8 ,25.10 ⁵	8,25	15,34
SB3	7,5.10 ⁵	5,72	12,75
	6 ,5.10 ⁵	4,72	14,75
	8 ,5.10 ⁵	6,72	10,75
SB4	5,5.10 ⁵	5,55	14,75
	4 ,5.10 ⁵	7,55	15,75
	6 ,5.10 ⁵	3,55	13,75
MOS1	8,75.10 ⁵	5,66	10,14
	7,75.10 ⁵	6,66	10,14
	9,75.10 ⁵	4,66	10,14
MOS2	9,2.10 ⁵	6,52	10,33
	9,2.10 ⁵	7,52	10,33
	9,2.10 ⁵	5,52	10,33
MOS3	7,5.10 ⁵	4,45	12,14
	7,5.10 ⁵	4,45	12,14
	7,5.10 ⁵	4,45	12,14
REL1	12.10 ⁵	6,25	14,75
	12.10 ⁵	7,25	13,75
	12.10 ⁵	5,25	15,75
REL2	8,5.10 ⁵	4,23	12,45
	7,5.10 ⁵	5,23	10,45
	9,5.10 ⁵	3,23	14,45
REL3	6,5.10 ⁵	5,25	14,45
	5,5.10 ⁵	5,25	15,45
	7,5.10 ⁵	5,25	13,45

Annexe 12 : Analyse de variance de la croissance mycélienne, de sporulation et de la taille des conidies des isolats de *A. rabiei*

1- Analyse de variance pour la croissance mycélienne des isolats de *A.rabiei*, 15 jours après leur culture sur milieu de culture CSMDA.

Source de variation	S.C.E	^a DDL	^b C.M.	Test F
Isolats	1125,172	11.5	202,133	299,152*
Erreur	32,254	75	0,112	

^aDDL : Degré de liberté; ^bCM: Carré moyen ; * : significatif à 0,05

2- Analyse de variance pour la sporulation des isolats de *A.rabiei*, après 15 jours d'incubation à 20 ± 2 °C, sur milieu CSMDA.

Source de variation	S.C.E	DDL	CM	Test F
Isolat	53,254	12	8,225	413,132*
Erreur	25,245	53	0,014	

* significatif à 0,01 (de 1 %)

3- Analyse de variance pour la longueur et la largeur des conidies

Taille des conidies	Source de variation	S.C.E	DDL	C.M	Test F
Longueur	Isolats	452,33	18	32,125	13,102*
	Erreur	2000,152	98	5,143	
Largeur	Isolats	16,235	11	1,122	18,153*
	Erreur	7,125	122	0,154	

* : significatif à 0,05 (à 5 %)

Annexe 13 : Le taux de germination des lignées de pois chiche testées (en %)

Lignées	Taux de germination en %
ILC482	100%
F 97-657	100%
ILC 3279	70%
ILC263	80%
F 03-19C	80%
Flip 05-69C	90%
F10-25	70%
INRA199	60%
F10-5/11	80%
Col 08	100%
GP 10	60%
Col 25/24	90%
F482	80%

Annexe 14 : Degrés de sévérité moyenne des isolats de *Ascochyta rabiei* sur la variété sensible de pois chiche (ILC 263).

Isolats	Degrés de sévérité
MSC1	7
MSC2	9
AT1	3
SB1	4
SB2	7
SB3	5,5
MOS1	3,5
MOS 2	7
REL1	6.5
REL2	5,5

Annexe 15: Notations de degrés de sévérité des symptômes sur les lignées de pois chiche après 10 jours de l'inoculation par les isolats de *Ascochyta rabiei*.

Lignées	Sévérité des symptômes des isolats de <i>A.rabiei</i> (a)									
	MSC1	MSC2	AT1	SB1	SB2	SB3	MOS1	MOS2	REL1	REL2
Col 08	7	8	6	6	5	6	8	6	7	6
	5	8	5	6	4	5	8	6	6	6
	8	8	7	6	6	7	8	6	8	6
F 97-657	5	6	5	5	3	5	3	5	5	1
	6	5	5	5	2	4	3	5	4	1
	4	7	5	5	4	6	3	5	6	1
ILC 3279	3	3	3	5	3	3	5	5	3	5
	3	2	4	5	3	3	6	5	3	5
	3	4	2	5	3	3	4	5	3	5
GP 10	7	6	5	6	7	8	8	7	6	6
	7	5	5	6	8	8	8	7	7	7
	7	7	5	6	6	8	8	7	5	5
F 03-19C	5	4	5	3	3	4	5	3	4	3
	5	4	5	3	2	3	6	3	4	3
	5	4	5	3	4	5	4	3	4	3
Col 15/24	6	8	5	7	8	6	5	8	7	5
	6	8	5	8	8	6	5	8	8	6
	6	8	5	6	8	6	5	8	6	4
Flip 05-69C	4	5	3	5	6	5	3	5	4	5
	5	5	3	6	7	5	3	5	5	5
	3	5	3	4	5	5	3	5	3	5
INRA199	7	4	5	5	4	5	6	4	6	6
	7	4	5	6	4	5	5	4	7	6
	7	4	5	4	4	5	7	4	5	6
F 10-5/11	6	3	1	6	5	3	5	3	4	5
	6	3	1	7	5	3	5	3	4	5
	6	3	1	5	5	3	5	3	4	5
F482	3	5	1	6	5	6	4	3	5	3
	3	5	1	5	5	7	4	3	5	3
	3	5	1	7	5	5	4	3	5	3
ILC 482	7	8	8	6	5	6	4	5	7	6

	7	8	8	6	4	7	4	5	7	5
	7	8	8	6	6	5	4	5	7	7
	8	6	7	6	7	4	8	6	7	5
	8	7	7	6	7	4	8	7	7	5
F1025	8	5	7	6	7	4	8	5	7	5

a : Sévérité de maladie est notée de 1 à 9, selon l'échelle de Reddy et Singh (1984)

Annexe 16 : Test de Newman-Keuls au seuil de 1 % pour la pathogénicité des isolats sur trois lignées de pois chiche différentielles.

Facteur1: Isolats

Isolats									
MSC1	MSC2	AT1	SB1	SB2	SB3	MOS1	MOS2	REL1	REL2
4.20 ^{de}	6.83 ^{bc}	5.86 ^{cd}	6.83 ^{bc}	4.56 ^{de}	6.66 ^{bc}	3.46 ^e	7.20 ^a	6.90 ^b	6.90 ^b

Facteur2: Lignées

Lignées		
ILC482	ILC3279	ILC1929
5.12 ^b	4.85 ^c	7.86 ^a

Annexe 17 : Etudes des caractères physico-chimiques et calculs des diamètres des isolats de *A.rabiei* (culture de 14 jours)

1-Diamètres des colonies (en mm) des isolats de *A.rabiei* dans différents milieux

Croissance mycélienne (Moyenne en mm)				
Isolats	Milieux de culture testés			
	Malt	CSMDA	PDA	Sabouraud
MSC1	06,33	12,50	08,33	04,50
	07,33	13,50	09,33	04,50
	05,33	11,50	07,33	04,50
AT1	05,33	10,33	06,25	03,50
	05,33	10,33	06,25	03,50
	05,33	10,33	06,25	03,50
SB1	08,25	12,25	10,50	04,25
	06,25	14,25	10,50	04,25
	10,25	10,25	10,50	04,25
MOS1	06,25	09,33	07,33	05,33
	08,25	09,33	08,33	05,33
	04,25	09,33	06,33	05,33
REL1	05,25	11,33	06,25	06,50
	05,25	10,33	06,25	06,50
	05,25	12,33	06,25	06,50

2- Diamètres des colonies (en mm) des isolats de *A.rabiei* avec différents durées d'éclairage

Isolats	Croissance mycélienne (Moyenne en mm)		
	Photopériode de 12H	Lumière continue	Obscurité continue
MSC1	14,50	10,00	08,00
	14,50	11,00	07,00
	14,50	09,00	09,00
AT1	12,50	09,16	08,50
	13,50	09,16	08,50
	11,50	09,16	08,50
SB1	17,50	12,00	10,00
	19,50	12,00	10,00
	15,50	12,00	10,00
MOS1	15,16	11,50	08,50
	15,16	11,50	08,50
	15,16	11,50	08,50
REL1	18,83	14,50	12,50
	18,83	15,50	11,50
	18,83	13,50	13,50

3- Diamètres des colonies (en mm) des isolats de *A.rabiei* avec différents températures

Isolats	Croissance mycélienne (Moyenne en mm)				
	T°=5°C	T°=15°C	T°=20°C	T°=25°C	T°=35°C
MSC1	05,00	15,00	33,00	42,70	05,00
	05,00	14,00	35,00	42,70	05,00
	05,00	16,00	34,00	42,70	05,00
AT1	05,00	18,50	33,20	34,00	05,00
	05,00	19,50	33,20	36,00	05,00
	05,00	17,50	33,20	32,00	05,00
SB1	05,00	25,00	45,40	55,80	05,00
	05,00	25,00	46,40	55,80	05,00
	05,00	25,00	44,40	55,80	05,00
MOS1	05,00	37,70	46,40	48,50	05,00
	05,00	37,70	46,40	50,50	05,00
	05,00	37,70	46,40	46,50	05,00
REL1	05,00	33,20	48,00	53,50	05,00
	05,00	33,20	50,00	54,50	05,00
	05,00	33,20	46,00	55,50	05,00

4- Diamètres des colonies (en mm) des isolats de *A.rabiei* avec différents pH

Isolats	Croissance mycélienne (Moyenne en mm)			
	pH 4	pH 5.5	pH 7	pH 8
MSC1	08,00	27,50	18,00	12,00
	07,00	29,50	20,00	09,00
	09,00	28,50	16,00	15,00
AT1	07,50	26,00	14,00	10,00
	05,50	26,00	14,00	09,00
	09,50	26,00	14,00	11,00
SB1	07,50	27,00	15,50	12,00
	07,50	23,00	17,50	12,00
	07,50	25,00	13,50	12,00
MOS1	06,50	26,50	18,50	14,50

	04,50	26,50	18,50	12,50
	08,50	26,50	18,50	16,50
REL1	08,00	30,50	15,50	10,00
	08,00	30,50	15,50	10,00
	08,00	30,50	15,50	10,00

Annexe 18 : La croissance mycélienne des isolats de *A.rabiei* et le taux d'inhibition sous l'effet de benomyl et carbendazime

1-Croissance mycélienne des isolats de *A.rabiei* témoin et traité (mm/j)

Isolats	Fongicides testés			
	Benomyl (1,5g/l)		Carbendazime (0,5 g/l)	
	Témoin	Traité	Témoin	Traité
MSC1	6,25	3,25	5,25	2,50
	5,50	4,25	6,25	3,50
	7,00	2,25	4,25	1,50
AT1	6,25	3,25	5,50	1,15
	6,00	3,25	5,50	1,25
	6,50	3,25	5,50	1,05
SBA1	7,50	3,50	6,50	1,25
	6,50	4,50	7,50	0,75
	8,50	2,50	5,50	1,75
MOS1	5,25	2,25	5,25	0,50
	6,00	3,25	5,25	0,50
	4,5	1,25	5,25	0,50
REL1	6,25	2,50	8,00	0,50
	7,00	3,50	9,00	0,50
	5,50	1,50	7,00	0,50

2-Taux d'inhibition (en %) de la croissance mycélienne de *A.rabiei* sous l'effet de benomyl et carbendazime.

Isolats	Benomyl	Carbendazime
MSC1	48	52,38
AT1	48	79,09
SBA1	53,33	80,76
MOS1	57,14	90,47
REL1	60	62,50

Annexe 19 : Réduction de l'incidence de l'anthracnose (RIM en %) de trois lignées de pois chiche sous l'effet de benomyl et carbendazime.

Fongicides utilisés		Benomyl (1.5g/l)			Carbendazime (0.5 g/l)		
Isolats / Lignées	Col08	F1025	ILC482	Col08	F1025	ILC482	
MSC1	41	29	43	74	76	75	
AT1	39	42	42	60	73	74	
SB1	50	40	42	75	78	71	
MOS1	34	40	38	75	65	72	
REL1	44	43	44	70	70	70	

Annexe 20: Vérification des identifiées des isolats par séquençage 99% *Ascochyta rabiei* isolate AR34 small subunit ribosomal RNA

Sequence ID: MT252609.1

>4 ITS ITS4 -- 8..589 of sequence

```
TCCTCCTGATCCGAGGTCAAGAGTGTA AAAATGTACTTTTGGACGTCGTCGTTATGAGTG
CAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATACGCCGGCTGCCAATTGTTTAAAGGC
GAGTCTACACGCAGAGGGCGAGACAAACACCCAACACCAAGCAAAGCTTGAAGGTACAAAT
GACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTC
GATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCG
ATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTA ACTATTATGTTTTTCAGACGCTGA
TTGCAACTGCAAAGGGTTTGATTTTGTCCAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGTA
AGTACTCAAAAGACATGGGTAAGAGGTAGCGGGCAAAGCCCACAACTCTAGGTAATGAT
CCTTCCGCAGGTCCCCCTACGGAAGGGTCATTACCTAGAGTTTGTGGGCTTTGCCCGCTA
CCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACTTACGTTTCCTCGGCGG
```

Annexe 21 : Questionnaire

Nom de l'agriculteur :

Nom de l'échantillonnage :

Date de l'échantillonnage :

-Lieu dit :

-Wilaya :

-Production total :

-Superficie total :

-Superficie (culture de pois chiche) :

I. Pourquoi pratiquez-vous la culture de pois chiche ?

1-

2-

3-

4-

-La culture de pois chiche vous paraît-elle suffisamment rentable ?

Oui ☐

Non ☐

Pourquoi ?

-Quelles sont les variétés cultivées?

- 1- 2-
3- 4-

II- Est-ce que vous appliquez la rotation agricole ?

Oui ☐ Non ☐

-Dans cette rotation, quels sont les types des cultures utilisées avec le pois chiche?

- 1- 2-
3- 4-

-Quelles sont les travaux culturaux que vous réalisés avant le semis ?

1- labour

Date de labour.....Outil de labour : disques/ socs

Profondeur

Outils personnels

Oui ☐ Non ☐

Condition du sol

2- Façon superficielle après labour (date et outils) :

3- Fumeur de fonds Super 46% Dates d'apport

Quelle est la date de culture?

Date

A-Après la récolte, que faits vous des débris de pois chiche qui restent?

Aliment pour les bétails enfouissement dans le sol brûlés

III- Quelles sont les maladies fréquemment rencontrées?

- 1-
2-
3-

- Pourrez-vous décrire les symptômes observés en général?

- 1-
2-
3-

Y a-t-il des maladies inconnues ou non identifiées dans votre région?

Oui ☐ Non ☐

IV - Quelles sont les variétés de pis chiche cultivées dans votre région?

- Locales
➤ Importés

-Quels sont les critères du choix de variété ?

- Production
- Résistance
- Deux
- -Quelle est la source de vous semences ?
- -Propre utilisation
- -Marché
- -Agricultures
- service agricole

V- Est-ce que vous essayez de contrôler ces maladies ou de réduire les dommages quelle cause à vos récoltes (traitement chimique)?

Oui

Non

Si oui, quel est le traitement réalisé?