

**UNIVERSITE BLIDA 1**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la vie**

**Département des Biotechnologies**

## **THÈSE DE DOCTORAT**

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Phytopathologie

# **IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DE LA RÉSISTANCE DU POIS FACE À LA FUSARIOSE VASCULAIRE**

Présentée par

**Delel MEKHALDI**

Devant le jury composé de :

F. AMMAD	MCA, Univ. Blida 1	Présidente
N. ROUAG	Professeur, Univ. Sétif 1	Examineur
O. TOUMATIA	MCA, Univ. Alger 1	Examineur
M. BENCHABANE	Professeur, Univ. Blida 1	Directeur de thèse
N. RISPAIL	Maitre de recherche, IAS, CSIC, Cordoue, Espagne	Co-directeur de thèse

Blida, Décembre 2020

## RESUMÉ

### Identification et caractérisation de la résistance du pois face à la fusariose vasculaire

Le travail porte sur l'identification et la caractérisation moléculaire et métabolique de la résistance du pois (*Pisum* spp.) face à la fusariose vasculaire causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (Fop). L'étude concerne l'évaluation du comportement de 88 génotypes de pois effectuée en deux phases: (1) une collection de 28 génotypes testés vis-à-vis de 4 souches de Fop (R1 : race 1, R2F42, Arg1 et Arg3 : race 2), (2) une autre collection élargie, composée de 60 génotypes testés vis-à-vis des deux souches de Fop, R2F42 et R1. Les expérimentations sont conduites en conditions semi-contrôlées (sous serre en polycarbonate). Les 4 souches pathogènes ont induit des symptômes typiques de la fusariose vasculaire sur les plants inoculés (flétrissement, jaunissement, dessèchement et/ou mort de la plante). Sur la base de ce tableau symptomatologique typique de cette trachéomycose, le paramétrage de son développement et de son évolution est examiné à travers les calculs des taux d'infection (TI%), des indices visuels de sévérité (VIS) et de l'aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC). Chez la première collection, les 28 génotypes sont résistants aux souches R1, Arg1 et Arg3, tandis que 23 génotypes sont résistants à la souche R2F42. Avec la deuxième collection, 49 génotypes sont résistants à la souche R1, alors que 17 génotypes seulement sont résistants à la souche R2F42. Selon les valeurs d'AUDPC, la souche R2F42 est la plus virulente, suivie par la souche R1. Les deux souches Arg1 et Arg3 sont les moins virulentes.

La quantification moléculaire de Fop chez 7 génotypes inoculés avec la souche R2F42, a été mise en évidence par RT-PCR. Les taux d'ADN de Fop enregistrés sont positivement corrélés avec les taux d'infection ( $r=0,953$ ). Les taux les plus faibles sont enregistrés chez les génotypes résistants 2370 (2,32‰ de l'ADN total) et 3068 (4,88‰), tandis que les génotypes sensibles 3029 et P648 ont enregistré les taux d'ADN, respectivement, les plus élevés (68,69‰ et 95,32‰). Ces résultats indiquent le potentiel des génotypes résistants à délimiter, ou à inhiber, la colonisation et la progression vasculaire du pathogène.

Le dosage, par HPLC, de la pisatine dans les racines de 4 génotypes de pois inoculés avec la souche R2F42, révèle des niveaux plus importants chez les génotypes résistants 3068 (0,57 µg/mg de racine) et 952 (0,4 µg/mg) par rapport au génotype sensible 3029 (0,15 µg/mg) et partiellement résistant 2996 (0,07 µg/mg), 24h après l'inoculation, mettant en évidence le rôle majeur de cette phytoalexine dans les mécanismes de défense chez le pois.

**Mots clés :** Fusariose vasculaire, *Pisum* spp, comportement, résistance, pisatine.

## ABSTRACT

### Identification and characterization of pea resistance against fusarium wilt

The work concerns identification, molecular and metabolic characterization of pea resistance (*Pisum* spp.) against fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (Fop). The study is about behavioral evaluation of 88 pea genotypes performed in two phases: (1) a collection of 28 genotypes tested against 4 Fop strains (R1: race 1, R2F42, Arg1 and Arg3: race 2), (2) an enlarged collection, composed of 60 genotypes tested against two Fop strains, R2F42 and R1. Experiments are conducted under semi-controlled conditions (in polycarbonate greenhouse). The 4 pathogenic strains induced typical symptoms of fusarium wilt on the inoculated plants (wilting, yellowing, drying and/or plant death). On the basis of this typical tracheomycosis symptom-pathological table, disease development and evolution parameter setting is examined through calculations of infection rate (TI%), visual index of severity (VIS) and area under the disease progress curve (AUDPC). Within the first collection, the 28 genotypes are resistant to strains R1, Arg1 and Arg3, while 23 genotypes are resistant to the strain R2F42. In the second collection, 49 genotypes are resistant to strain R1, while only 17 genotypes are resistant to strain R2F42. According to the AUDPC values, strain R2F42 is the most virulent, followed by strain R1. Both strains Arg1 and Arg3 are less virulent.

Fop molecular quantification of 7 genotypes inoculated with the strain R2F42 was highlighted by RT-PCR. The recorded Fop DNA rates positively correlate with the infection rates ( $r=0.953$ ). The lowest rates were recorded in resistant genotypes 2370 (2.32‰ of total DNA) and 3068 (4.88‰), while sensitive genotypes 3029 and P648 recorded the highest Fop DNA rates (68.69‰ and 95.32‰ respectively). These results indicate resistant genotypes potential to delimit, or to inhibit, colonization and vascular progression of the pathogen.

Pisatin determination, by HPLC, carried out on roots of 4 pea genotypes, 24 hours after being inoculated with the strain R2F42, reveals higher levels in resistant genotypes 3068 and 952 (respectively 0.57 µg/mg of root and 0.4 µg/mg) compared to sensitive genotype 3029 (0.15 µg/mg) and the partially resistant genotype 2996 (0.07 µg/mg), highlighting the major role of this phytoalexin in peas defense mechanisms.

**Key words:** Fusarium wilt, *Pisum* spp, behavior, resistance, pisatin.

## ملخص

### تحديد وتشخيص مقاومة البازلاء لذبول الفيوزاريوم الوبائي

يهدف العمل إلى التعيين و التوصيف الجزيئي و الأيضي لمقاومة البازلاء (*Pisum spp.*) ضد ذبول الفيوزاريوم الوبائي الناجم عن (*Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (Fop). تتعلق الدراسة بتقييم سلوك 88 نمط جيني للباذلاء أُجريَ على مرحلتين: (1) مجموعة من 28 نمط جيني اختُبرت ضد 4 سلالات من Fop: R1: سلالة 1 ، R2F42 ، Arg 1 و Arg3: سلالة 2 ، (2) مجموعة ثانية أكثر اتساعاً مكونة من 60 نمط جيني اختُبرت ضد السلالتين R1 و R2F42. أُجريت التجارب في ظروف شبه مراقبة (في بيت بلاستيكي). تسببت السلالات الأربعة الممرضة في ظهور أعراض نموذجية لذبول الفيوزاريوم الوبائي على النباتات المطعمة (ذبول، إصفار، جفاف و/أو موت النبتة). على أساس الجدول النمطي لأعراض هذا المرض، تم تقييم تطوره وتقدمه من خلال حساب معدل الإصابة (%TI)، مؤشر شدة المرض (VIS) والمساحة تحت منحنى تطور المرض (AUDPC). في المجموعة الأولى، كان 28 نمطاً جينياً مقاوماً للسلالات R1 ، Arg1 و Arg3 ، في حين أن 23 نمطاً جينياً كان مقاوماً للسلالة R2F42. بالنسبة للمجموعة الثانية، 49 نمطاً جينياً كان مقاوماً للسلالة R1، في حين أن 17 نمطاً جينياً فقط كان مقاوماً للسلالة R2F42. وفقاً لتقييم AUDPC، كانت السلالة R2F42 أكثر شراسة، تليها السلالة R1. السلالتان Arg1 و Arg3 كانتا الأقل شراسة.

تم التقدير الكمي الجزيئي لـ Fop ، عند 7 أنماط جينية مُطعمة بالسلالة R2F42، بواسطة RT-PCR. الكميات المسجلة للحمض النووي لـ Fop كانت مرتبطة إيجاباً مع معدلات الإصابة ( $r=0.953$ ). تم تسجيل أدنى الكميات عند النمطين الجينيين المقاومين 2370 (2.32% من إجمالي الحمض النووي) و 3068 (4.88%) ، بينما سجل النمطان الجينيان الحساسان 3029 و P648 أعلى كميات الحمض النووي لـ Fop (68.69% و 95.32% على التوالي). تشير هذه النتائج إلى قدرة الأنماط الجينية المقاومة على إيقاف أو تثبيط اجتياح وتقدم العامل الممرض في أوعية النبات.

كشفت معايرة *pisatine* بواسطة HPLC، في جذور 4 أنماط جينية مُطعمة بالسلالة R2F42، عن مستويات أعلى في النمطين الجينيين المقاومين 3068 (0.57 مكغ/ملغ من الجذور) و 952 (0.4 مكغ/ملغ)، مقارنة بالنمط الجيني الحساس 3029 (0.15 مكغ/ملغ) و المقاوم جزئياً 2996 (0.07 مكغ/ملغ)، و ذلك 24 ساعة بعد التطعيم، مما يدل على الدور الرئيسي للـ *pisatine* في آليات الدفاع عند البازلاء.

**الكلمات المفتاحية:** ذبول الفيوزاريوم الوبائي، *Pisum spp.* ، سلوك، مقاومة، *pisatine*.

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à écrire un « MERCI » sincère à mon promoteur, **Pr. Messaoud BENCHABANE**, qui je lui dois tout mon respect et ma considération. Mes mots ne seront jamais suffisants pour lui exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Je lui remercie de tout mon cœur pour le soutien dont il a fait preuve à mon égard, tout au long de ma formation. Je lui remercie aussi d'avoir enrichi mes connaissances et de m'avoir toujours guidé. Je salue son amabilité, sa patience, sa disponibilité, sa souplesse d'esprit et son savoir. Qu'il sache qu'il restera mon exemple, et que je suis très fière d'être l'étudiante d'un professeur aussi exceptionnel.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à mon co-promoteur **Dr. Nicolas RISPAIL** pour le temps consenti pour suivre mon travail durant mon stage à Cordoue, malgré ses nombreuses responsabilités. Je lui remercie également pour ses précieuses remarques et orientations qui ont bien enrichi la thèse. Qu'il trouve ici mes sincères reconnaissances.

Je tiens à remercier chaleureusement **Dr. Faiza AMMAD** qui a gracieusement accepté de présider le jury, mais aussi pour ses encouragements et motivation. Que **Pr. Noureddine ROUAG** et **Dr. Omrane TOUMATIA**, trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté de participer à l'expertise de cette thèse et pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.

Un merci très spécial à l'ingénieur de laboratoire de mycologie, notre chère **Djamila FADIL**, qui m'a appris tous les principes de manipulation des champignons. Je la remercie énormément pour sa disponibilité, ses précieux conseils et ses encouragements. Je remercie également **Walid BOUARAR** et **Hayat LAKHDARI**, ingénieurs de laboratoire de virologie et de microbiologie, pour leur disponibilité le long de la période de mes expérimentations. Je tiens aussi à remercier **Malika**, secrétaire au service PGRS de notre faculté pour son efficacité et sa sympathie.

Je remercie aussi du fond du cœur **Hind BENKOURTEBY**, pour m'avoir prodigué de bons encouragements. Je n'oublie pas à remercier aussi **Samira**

**OUSERIR** et **Rafik BERDJA** qui ont été toujours prêts à m'aider. Mes remerciements s'adressent aussi à **Dr. Moustafa BANI**, MCA à l'ENSB de Constantine, pour son aide et ses orientations.

Je tiens à remercier toutes les étudiantes qui ont participé à la réalisation de ce travail sous ma direction : **Kessoum F.Z., Benmira Zitouni R., Herida N., Goudjil S., Abdelmoumen W., Hafsi A., Benmoussa B.** et **Kara L.**

Je remercie ma famille : mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, mes frères, ma sœur et mes belles-sœurs, pour leur inestimable soutien et encouragements.

Enfin que toutes les personnes, qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Ce travail est dédié à ma formidable famille :

- A **mon cher Papa** et à **ma chère Maman**, maigres récompenses pour l'immense effort et sacrifice. Que Dieu vous garde et vous protège.
- A mes chers frères **Aissam, Chems-Eddine** et **Zakaria**.
- A ma chère sœur **Sanaa**.
- A mes chères belles-sœurs **Yacina** et **Rima**.
- A mes nièces chéries **Mariem, Nour, Manar, Amena** et **Sirine**.
- Et à mon neveu **Abd-Essamad**.

# TABLE DES MATIÈRES

RESUME

ABSTRACT

ملخص

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAU

INTRODUCTION.....	13
1. CHAPITRE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	16
1.1. Le pois ( <i>Pisum</i> spp.) .....	16
1.1.1. Les légumineuses .....	16
1.1.2. Origine .....	16
1.1.3. Taxonomie .....	17
1.1.4. Description botanique et écologie de la plante.....	18
1.1.5. Usages et valeur nutritive.....	20
1.1.6. Production du pois .....	22
1.1.6.1. Dans le monde.....	22
1.1.6.2. En Algérie .....	22
1.1.7. Facteurs limitant la production .....	23
1.1.7.1. Stress abiotiques .....	23
1.1.7.2. Stress biotiques .....	24
a. Ravageurs et parasites.....	24
b. Principales maladies bactériennes et virales .....	24
c. Principales maladies fongiques .....	25
1.2. La fusariose vasculaire du pois.....	26
1.2.1. Généralités sut <i>Fusarium oxysporum</i> .....	26
1.2.2. Caractéristiques morphologiques.....	27
1.2.3. Processus d'infection .....	28
1.2.3.1. Pénétration .....	28
1.2.3.2. Colonisation.....	29
1.2.3.3. Conservation.....	30
1.2.4. Mécanismes parasitaires .....	30
1.2.4.1. Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire .....	30

1.2.4.2.	Production de toxines .....	30
1.2.4.3.	Autres mécanismes .....	31
1.2.5.	Races de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>pisii</i> .....	31
1.2.6.	Symptômes de la maladie .....	32
1.2.7.	Epidémiologie .....	33
1.2.8.	Méthodes de lutte contre la maladie .....	33
1.2.8.1.	Lutte culturale .....	34
1.2.8.2.	Lutte chimique .....	34
1.2.8.3.	Lutte biologique .....	35
1.2.8.4.	Lutte génétique .....	35
1.3.	Résistance des plantes face aux maladies parasitaires .....	35
1.3.1.	Résistance quantitative .....	37
1.3.1.1.	Résistance incomplète <i>versus</i> résistance complète .....	37
1.3.1.2.	Phénotype de la résistance quantitative .....	38
1.3.1.3.	Génomique de la résistance quantitative .....	38
1.3.1.4.	Avantages de la résistance quantitative .....	40
1.3.2.	Mécanismes de résistance chez les plantes .....	41
1.3.2.1.	Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) .....	41
1.3.2.2.	Les barrières structurales .....	42
1.3.2.3.	Les protéines liées à la pathogénèse .....	43
1.3.2.4.	Rôle des phytohormones .....	44
1.3.2.5.	Les phytoalexines .....	45
	a. Historique .....	45
	b. Modulation et voies de biosynthèse .....	45
	c. Les phytoalexines chez les légumineuses .....	46
1.3.3.	Ressources génétiques et amélioration de la résistance chez le pois .....	48
1.3.3.1.	Ressources génétiques .....	48
1.3.3.2.	Sélection et amélioration génétique .....	49
2.	CHAPITRE 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	51
2.1.	Etude de comportement de génotypes de pois face à la fusariose vasculaire .....	51
2.1.1.	Matériel biologique .....	51
2.1.1.1.	Première collection .....	51
2.1.1.2.	Deuxième collection .....	53

2.1.2. Prégermination des graines .....	53
2.1.3. Inoculum fongique.....	53
2.1.4. Inoculation des plantules.....	54
2.1.5. Traitements étudiés.....	54
2.1.5.1. Première collection (28 génotypes) .....	54
2.1.5.2. Deuxième collection (60 génotypes).....	54
2.1.6. Paramètres d'évaluation .....	59
2.1.6.1. Suivi symptomatologique.....	59
2.1.6.2. Taux d'infection.....	59
2.1.6.3. Indice de sévérité de la maladie (VIS) .....	60
2.1.6.4. Courbe des aires de progression de la maladie (AUDPC) .....	61
2.1.7. Analyses statistiques.....	61
2.2. Quantification moléculaire de Fop <i>in planta</i> .....	61
2.2.1. Matériel biologique .....	61
2.2.2. Inoculation et mise en culture .....	62
2.2.3. Extraction de l'ADN.....	62
2.2.4. Quantification par PCR en temps réel.....	63
2.3. Dosage de la pisatine.....	64
2.3.1. Matériel biologique .....	64
2.3.2. Inoculation et mise en culture .....	64
2.3.3. Extraction de la phase organique.....	64
2.3.4. Séparation des composants par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....	65
3. CHAPITRE 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	67
3.1. Comportement des 28 génotypes de pois vis-à-vis des 4 souches de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>pisi</i> .....	67
3.1.1. Description symptomatologique .....	67
3.1.2. Taux d'infection et VIS .....	73
3.1.3. AUDPC .....	75
3.1.4. Corrélation entre taux d'infection et VIS .....	79
3.2. Comportement de la nouvelle collection de 60 génotypes de pois face aux 2 souches de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>pisi</i> .....	80
3.2.1. Description symptomatologique .....	80

3.2.2. Taux d'infection.....	83
3.2.3. AUDPC .....	87
3.3. Quantification moléculaire de Fop <i>in planta</i> .....	91
3.4. Dosage de la pisatine.....	93
3.4.1. Après 24h de l'inoculation .....	93
3.4.2. Après 48h de l'inoculation .....	94
3.4.3. Après 15 jours de l'inoculation .....	94
3.5. Discussion.....	96
CONCLUSION .....	106
APPENDICES .....	109
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	126

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

<b>Figure 1.1 :</b>	Dessin d'un plant de <i>Pisum sativum</i> .....	19
<b>Figure 1.2 :</b>	Caractéristiques morphologiques de <i>F. oxysporum</i> .....	28
<b>Figure 1.3 :</b>	Cycle infectieux de <i>F. oxysporum</i> .....	29
<b>Figure 1.4 :</b>	Symptômes de la fusariose vasculaire du pois.....	33
<b>Figure 1.5 :</b>	Vue globale de l'interaction plante-pathogène.....	36
<b>Figure 1.6 :</b>	Schéma simplifié de la biosynthèse de la pisatine chez le pois.....	47
<b>Figure 2.1 :</b>	Dispositif expérimental adopté pour la collection de 28 génotypes de pois en interaction avec les 4 souches de Fop.....	56
<b>Figure 2.2 :</b>	Dispositif expérimental adopté pour la collection de 60 génotypes de pois en interaction avec les 2 souches de Fop.....	58
<b>Figure 2.3 :</b>	Echelle de l'évaluation des symptômes de la fusariose vasculaire.....	60
<b>Figure 2.4 :</b>	Conditions thermiques de la RT-PCR.....	63
<b>Figure 3.1 :</b>	Evolution des symptômes de la fusariose vasculaire sur les feuilles du pois.....	67
<b>Figure 3.2 :</b>	Progression des symptômes de la fusariose vasculaire chez le génotype Séfrou inoculé avec la souche R1.....	68
<b>Figure 3.3 :</b>	Progression des symptômes de la fusariose vasculaire chez le génotype Messire inoculé avec la souche R2F42.....	69
<b>Figure 3.4 :</b>	Comportement du génotype Messire, 31 jours après son inoculation avec les quatre souches de Fop.....	70
<b>Figure 3.5 :</b>	Aspect des racines du génotype P632, 31 jours après l'inoculation avec les quatre souches de Fop.....	71
<b>Figure 3.6 :</b>	Symptômes internes chez le génotype Messire, 31 jours après l'inoculation avec les quatre souches de Fop (G: ×8).....	72
<b>Figure 3.7 :</b>	Valeurs effectives de VIS des 28 génotypes de pois, 31 jours après leur inoculation avec les quatre souches de Fop.....	74
<b>Figure 3.8 :</b>	Evolution des valeurs VIS des génotypes 74SN5, 2946, P651, Merveille de Kelvedon et P21 inoculés avec les quatre souches de Fop.....	75
<b>Figure 3.9 :</b>	Valeurs effectives d'AUDPC des 28 génotypes de pois inoculés avec les quatre souches de Fop.....	76

<b>Figure 3.10 :</b>	Valeurs minimales et maximales d'AUDPC des 28 géotypes de pois.....	78
<b>Figure 3.11 :</b>	Valeurs minimales et maximales d'AUDPC des quatre souches de Fop.....	79
<b>Figure 3.12 :</b>	Corrélation de la distribution des VIS et taux d'infection.....	80
<b>Figure 3.13 :</b>	Comportement des géotypes, 10 jours après leur inoculation avec les souches R1 et R2F42 de Fop par rapport aux témoins (EDS).....	81
<b>Figure 3.14 :</b>	Comportement des géotypes, 31 jours après leur inoculation avec les souches R1 et R2F42 de Fop par rapport aux témoins (EDS).....	81
<b>Figure 3.15 :</b>	Aspect des racines des plantes, 31 jours après l'inoculation.....	82
<b>Figure 3.16 :</b>	Symptômes internes chez le géotype P691, 31 jours après l'inoculation (G: 3,2×10).....	83
<b>Figure 3.17 :</b>	Symptômes internes chez le géotype 223, 31 jours après l'inoculation (G: 10×10).....	83
<b>Figure 3.18 :</b>	Valeurs effectives du taux d'infection des 60 géotypes de pois, 31 jours après leur inoculation avec la souche R1 de Fop.....	85
<b>Figure 3.19 :</b>	Valeurs effectives du taux d'infection des 60 géotypes de pois, 31 jours après leur inoculation avec la souche R2F42 de Fop.....	86
<b>Figure 3.20 :</b>	Répartition (nombre) de géotypes de pois par souche de Fop selon le taux d'infection.....	87
<b>Figure 3.21 :</b>	Valeurs effectives d'AUDPC des 60 géotypes de pois inoculés avec la souche R1 de Fop.....	88
<b>Figure 3.22 :</b>	Valeurs effectives d'AUDPC des 60 géotypes de pois inoculés avec la souche R2F42 de Fop.....	89
<b>Figure 3.23 :</b>	Valeurs minimales et maximales d'AUDPC des 60 géotypes de pois .....	90
<b>Figure 3.24 :</b>	Taux de l'ADN de la souche R2F42 de Fop par rapport à l'ADN total selon le géotype du pois.....	91
<b>Figure 3.25 :</b>	Corrélation entre le taux d'ADN de Fop et le taux d'infection enregistré par les géotypes de pois étudiés.....	92
<b>Figure 3.26 :</b>	Teneur en pisatine 24 heures après l'inoculation.....	93
<b>Figure 3.27 :</b>	Teneur en pisatine 48 heures après l'inoculation.....	94
<b>Figure 3.28 :</b>	Teneur en pisatine 15 jours après l'inoculation.....	95

<b>Figure 3.29 :</b>	Evolution de la teneur en pisatine des géotypes de pois étudiés.....	96
<b>Tableau 1.1 :</b>	Valeur nutritive du pois (par 100g).....	21
<b>Tableau 2.1 :</b>	Désignation des 28 géotypes du pois.....	52
<b>Tableau 2.2 :</b>	Origine et provenance des souches de Fop.....	52
<b>Tableau 2.3 :</b>	Traitements étudiés de l'interaction des 28 géotypes de pois avec les quatre souches de Fop.....	55
<b>Tableau 2.4 :</b>	Traitements étudiés de l'interaction des 60 géotypes de pois avec les deux souches de Fop.....	57
<b>Tableau 2.5 :</b>	Composition du mélange pour la RT-PCR pour un tube.....	64
<b>Tableau 2.6 :</b>	Caractéristiques analytiques de la courbe d'étalonnage de la pisatine.....	66

## INTRODUCTION

Les légumineuses, en plus de leur richesse en protéines, jouent un rôle considérable dans la durabilité des agroécosystèmes, grâce à leur particularité de pouvoir fixer l'azote atmosphérique *via* leur interaction symbiotique avec certaines rhizobactéries [1]. Elles font partie intégrale du régime méditerranéen et sont une source de nourriture animale et de fourrage [2, 3, 4]. Le pois (*Pisum sativum* L.) couramment appelé «petits pois», est la cinquième légumineuse la plus cultivée dans le monde [5], en raison de sa consommation alimentaire croissante et de son adaptation à la fois aux régions chaudes de la Méditerranée et aux régions tempérées. Cette plante est considérée parmi les plus anciennes cultures domestiquées dans le monde [6]. Bien qu'elle se pratique comme une culture homogène, une certaine hétérogénéité a été signalée chez des variétés traditionnelles, des cultivars et des génotypes anciens [7, 8].

En 2018, plus de 10 millions d'hectares de pois ont été cultivés dans le monde, assurant une production de près de 35 millions de tonnes. Durant cette période, notre pays était en pole position en Afrique du nord, avec une superficie de 46 280 ha et une production de 197 675 tonnes [5].

Comme toutes les légumineuses, le pois est susceptible aux stress abiotiques, notamment au déficit hydrique et à la salinité du sol. La sécheresse est le principal facteur abiotique limitant la production. Dans les pays méditerranéens, le déficit hydrique est devenu habituel, non seulement dans les régions arides et semi-arides, mais également dans les régions littorales et sub-littorales en raison de l'uniformité des précipitations et de l'irrégularité dans leur distribution par rapport au cycle végétatif de cette culture. De plus, les maladies d'origine biotique, sont une menace permanente qui limitent fortement la culture du pois en réduisant ses rendements en graines et en biomasse [9, 10].

Dans les conditions méditerranéennes propices, chaque cycle de culture est menacé par le cumul et/ou l'interaction des stress biotiques et abiotiques. Parmi les bioagresseurs, *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (Fop) est un champignon

phytopathogène du sol qui cause de graves pertes dans tous les pays où le pois est cultivé [11, 12]. Ce pathogène tellurique peut survivre sous forme de chlamydospores, qui restent viables dans le sol pendant plusieurs années [13]. Le pathosystème pois-Fop est d'une complexité accrue, en raison de la présence de différentes races variables par leur virulence et leur spécificité parasitaire. Ainsi, Fop est représenté principalement par quatre races différentes classées selon leur capacité à induire la maladie dans un ensemble de lignées différentielles. Parmi ces races, les races 1 et 2 ont été signalées dans le monde entier [14]. De plus, Fop évolue continuellement, avec l'émergence de nouvelles variantes du pathogène [11].

En Algérie, la fusariose vasculaire du pois est peu étudiée. Néanmoins, la présence de cette maladie a été signalée au niveau des plaines côtières et intérieures, des hauts plateaux et du Sahara, en notant la distribution et la fréquence des races 1, 2, 5 et 6 du pathogène [15].

Le contrôle de la fusariose vasculaire se fonde principalement sur l'intégration des différentes méthodes de gestion, y compris les pratiques culturales, la désinfection des sols, le biocontrôle et l'amélioration de la résistance des génotypes cultivés [16, 17, 18, 19, 20]. L'utilisation de cultivars résistants reste la méthode la plus appropriée, en plus de son adéquation avec les nouvelles orientations dans les pratiques agronomiques durables et respectueuses de l'environnement [21, 22].

Des sources de résistance à Fop, de type monogénique, ont été décrites chez le pois et utilisées pour développer des cultivars résistants. Cependant, ce mécanisme qualitatif de résistance a été rapidement dépassé par l'apparition de nouvelles variantes du pathogène [14]. Il est donc important d'identifier de nouvelles sources de résistance et de centrer les efforts sur les mécanismes quantitatifs et polygéniques qui sont plus difficiles à neutraliser par le pathogène et qui, par conséquent, permettent d'augmenter la durabilité de la résistance. Déterminer quels sont les mécanismes conférant la résistance, chez les nouvelles sources phylogénétiques, est aussi primordial pour pouvoir cibler et accumuler les mécanismes les plus intéressants dans un même cultivar.

Parmi ses thématiques de recherche, notre laboratoire LPVRAB (Laboratoire de Protection et de Valorisation des Ressourcse Agrobiologiques), s'inscrit dans la détection et l'identification d'éventuels caractères de résistance du pois à la fusariose vasculaire et son biocontrôle. Dans le cadre d'un projet de coopération avec l'institut de l'agriculture durable (IAS-CSIC : *Instituto de Agricultura Sostenible, Córdoba, España*), nous avons réalisé un premier travail portant sur l'étude du pathosystème *Pisum* spp.-Fop [23]. D'autres travaux ont porté sur le biocontôle de la maladie par l'utilisation des bactéries bénéfiques [24], ou sur l'étude de comportement de génotypes de pois dans des conditions d'infection naturelle en plein champ [25].

Donc, notre étude s'intéresse à plusieurs aspects, portant à la fois sur le comportement du matériel végétal, les mécanismes impliqués dans la défense selon les génotypes et l'identification de sources de résistance chez le pois. Ainsi, notre travail a trois principaux objectifs :

1. Identification de nouvelles sources de résistance chez le pois (*Pisum* spp.) en conditions semi-contrôlées sous serre, réalisée en deux phases :
  - Une première collection de 28 génotypes vis-à-vis de quatre souches phytopathogènes de Fop.
  - Une nouvelle collection, plus élargie, portant sur 60 autres génotypes vis-à-vis de deux souches de Fop.
2. Etude de la colonisation du pois par quantification moléculaire du pathogène *in planta*.
3. Caractérisation métabolique de la résistnace du pois, en conditions d'inoculation expérimentale, par dosage de la pisatine.

# CHAPITRE 1

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1. Le pois (*Pisum* spp.)

#### 1.1.1. Les légumineuses

Les légumineuses, troisième grande famille d'angiospermes [26], occupent une place considérable dans les régimes alimentaires traditionnels à travers le monde et souvent conseillées pour une alimentation saine et diététique [4]. Elles sont représentées surtout par les différents types de pois, les lentilles, les haricots, les arachides et autres plantes à gousses [27]. Les instances internationales encouragent leur introduction dans les régimes alimentaires du monde entier. L'organisation des Nations Unies (ONU) a proclamé 2016 comme l'année internationale des légumineuses, suggérant qu'elles devraient occuper une plus grande place dans notre alimentation actuelle [28].

Les légumineuses présentent une source importante de nutriments essentiels, notamment des protéines, des glucides à faible indice glycémique, des fibres alimentaires, des minéraux et des vitamines. Elles sont particulièrement riches en protéines et en fibres alimentaires [29]. Ces espèces végétales, grâce à leurs aptitudes symbiotiques avec certaines catégories de bactéries du sol fixatrices d'azote, peuvent s'enrichir davantage en protéines alimentaires [30].

Les légumineuses sont connues pour leur capacité à améliorer la fertilité du sol. Elles accroissent l'apport en azote par sa fixation symbiotique, elles augmentent la disponibilité du phosphore *via* leurs racines et elles améliorent les propriétés physico-chimiques du sol grâce à leur enracinement intensif [1, 31, 32].

#### 1.1.2. Origine

L'origine et la progéniture de *Pisum sativum* ne sont pas bien connues, même s'il a été rapporté que la région méditerranéenne, l'Asie occidentale et centrale et l'Ethiopie soient des lieux primaires de culture de ces plantes. Récemment, la

FAO a désigné l'Éthiopie et l'Asie occidentale comme centres de diversité, avec des centres secondaires en Asie du sud et dans la région méditerranéenne. Des traces archéologiques de l'utilisation du pois datant de 8000 ans avant Jésus Christ, ont été trouvées dans le Croissant Fertile [33].

La première culture du pois semble avoir été en Asie occidentale, d'où il s'est répandu en Europe, en Chine et en Inde. Le pois était déjà bien connu dans les régions montagneuses de l'Afrique centrale et orientale, avant l'arrivée des Européens et était une culture vivrière bien établie et importante au Rwanda et dans le sud-ouest de l'Ouganda en 1860. L'utilisation des gousses comestibles a été décrite pour la première fois aux Pays-Bas et en France au 16<sup>ème</sup> siècle, tandis que l'utilisation de graines immatures comme légume a commencé en Europe un siècle plus tard [33].

Dans son livre « Enquête sur les plantes », traduit par HORT, THEOPHRASTUS a également cité l'existence de traces du pois bien avant l'an 300 avant Jésus Christ. Il a décrit plusieurs espèces de légumineuses et particulièrement de pois et a indiqué que des pois ont été employés en tant que fourrage et nourriture humaine. Selon ces études, il devient apparent que l'origine du pois doit être située dans la région d'Abyssinie et de l'Afghanistan. Il a ensuite colonisé les zones méditerranéennes avant de se répandre à d'autres régions de l'Europe et de l'Asie [34].

### 1.1.3. Taxonomie

Le genre *Pisum* fait partie de la famille des *Fabaceae*, de la sous-famille des *Papilionaceae* et de la tribu des *Vicieae*. Une grande diversité morphologique a été observée entre les plantes sauvages du pois. De nombreuses espèces furent donc initialement décrites par les botanistes pour différencier ces plantes suivant leurs caractéristiques morphologiques à l'exemple de *Pisum formosum*, *P. transcausicum*, *P. abyssinicum*, *P. aethiopicum*, *P. arvense* et *P. sativum* qui est la plus répandue [35].

Le grand nombre d'unités taxonomiques proposées au sein du genre *Pisum* a été considérablement réduit par un simple système compromis, basé sur trois

espèces, proposé par MAXTED et AMBROSE [36], qui est adopté par la plupart des auteurs actuels :

- *Pisum fulvum* Sibth et Smith, une espèce sauvage ;
- *Pisum abyssinicum* A. Br., une espèce uniforme cultivée localement (avec les pois communs) au Yémen et en Ethiopie ;
- *Pisum sativum* L., extrêmement variable et classiquement divisée en deux sous-espèces: *P. sativum* ssp. *sativum* L. englobant les pois cultivés et *P. sativum* ssp. *elatius* (Bieb.) Aschers. et Graebn., englobant toute la diversité des formes sauvages allant du Portugal au Turkménistan et de l'Afrique du Nord à la Normandie.

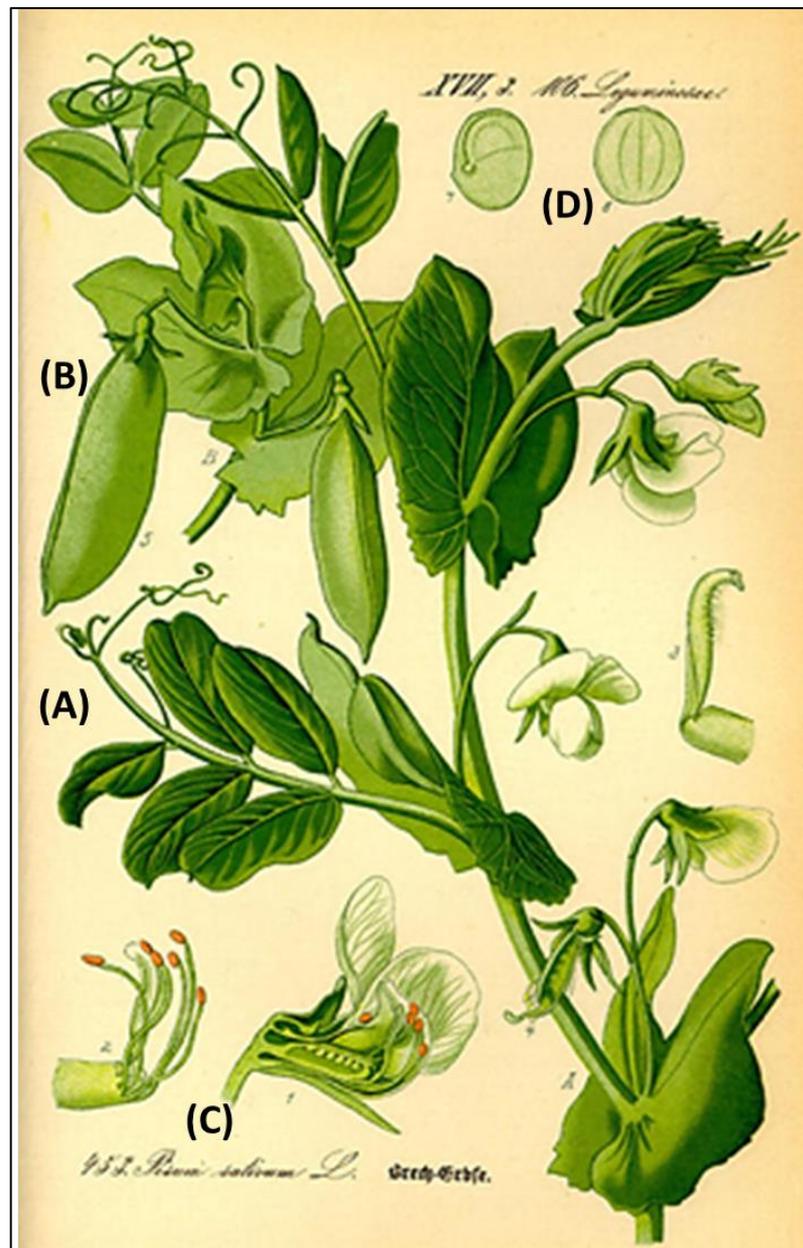
Selon ce système, *P. sativum* ssp. *elatius* est paraphylétique en tant que progéniteur de *P. sativum* ssp. *sativum*, et il n'est qu'une collection formelle qui regroupe tous les représentants sauvages de l'espèce. Le statut spécifique de *P. abyssinicum* est équivoque dont certains auteurs considèrent ce taxon comme *P. sativum* ssp. *abyssinicum* [37, 38, 39, 40].

La taxonomie du pois est loin d'être satisfaisante et finale, car elle a subi une division taxonomique excessive dans le passé. De plus, plusieurs lacunes dans cette taxonomie peuvent être révélées : l'identification erronée des pois cultivés d'origine spontanée par rapport aux pois sauvages et le manque de pois véritablement sauvages dans les collections de matériel génétique parfois confuses, les informations géographiques insuffisantes sur les géotypes, la contamination et les croisements incontrôlés [41].

#### 1.1.4. Description botanique et écologie de la plante

Les feuilles du pois sont composées de 4 à 6 folioles à disposition alterne (Figure 1.1A). Elles ont différentes teintes du vert jaune au vert bleu foncé. Les folioles sont entières ou plus ou moins dentées, de forme ovale ou elliptique, leur extrémité est arrondie et crénelée, pointue ou tronquée selon les géotypes. La feuille se prolonge par des vrilles terminales de plusieurs centimètres de long. Le fruit du pois est de type gousse de 4 à 11 cm de longueur, dont elle contient 5 à 10 graines (Figure 1.1B) [6].

La fleur du pois est typique de la famille de *Papilionaceae* (Figure 1.1C). La corolle contient cinq pétales : deux ailes et une quille formée de la fusion de deux pétales entourant dix anthères et un style. Le pois est cléistogame et doit être considéré en tant qu'espèce strictement auto-fertile, bien que le xylocope (abeille charpentière) et le mégachile (abeille solitaire) fréquentent les fleurs et puissent être responsables des hybridations naturelles. Ainsi, le mélange génétique peut avoir lieu sans intervention des sélectionneurs. Les populations naturelles et les variétés se composent des plantes génétiquement stables [42].



**Figure 1.1** : Dessin d'un plant de *Pisum sativum* [43].

(A) Feuille, (B) gousse, (C) fleur et (D) graine de pois.

Comme la plupart des légumineuses, les plantes de pois présentent une croissance indéterminée. Les premiers nœuds, dont certains donnent les branches, sont végétatifs, alors que les nœuds suivants sont reproducteurs. Généralement, chaque nœud reproducteur donne naissance à deux fleurs à partir desquelles les gousses se développent. Le nombre de graines par gousse dépend de la variété et des conditions environnementales [42].

La culture du pois a besoin d'un climat relativement frais. Les températures moyennes doivent être comprises entre 7 et 24 °C. Il peut être affecté si la température maximale quotidienne dépasse un seuil de 25 à 28 °C en plein champ [44]. Le pois peut être cultivé dans les régions où les précipitations ne dépassent pas 400 mm, mais la pluviométrie idéale se situe entre 800 et 1000 mm par an. Le pois est légèrement sensible à la photopériode mais les jours longs favorisent sa floraison. Il pousse sur des sols de toutes natures, dotés de niveaux de fertilité modérés, bien drainés et à pH de 5,5 à 7 [3]. Le cycle végétatif du pois est d'environ 140 jours pour les variétés de printemps, pouvant descendre à 90 jours pour les variétés très précoces et remonte jusqu'à 240 jours pour les variétés d'hiver [45].

#### 1.1.5. Usages et valeur nutritive

Les pois possèdent plusieurs usages finaux dont les feuilles, les gousses vertes, la graine verte non mûre et la graine mûre sèche peuvent être utilisées comme nourriture humaine ou alimentation animale. Pour l'alimentation humaine, le pois est principalement consommé à l'état frais (85% d'eau). Pour cela, les graines sont récoltées avant maturité (les petits pois verts de maraîchage classés comme légume frais). Il peut aussi être consommé à l'état sec (15% d'eau) lorsque les graines sont récoltées à maturité au stade sec (pois cassé classé comme légume sec). Dans certaines régions asiatiques, les jeunes pousses feuillées sont aussi consommées [2, 3].

Dans le cas de l'alimentation animale, la plante entière fraîche ou ensilée sèche est utilisée comme fourrage pour les ruminants. En général, les pois dits « fourragers » incluent tout type de pois destiné à l'alimentation animale, y compris les pois secs en grains qui sont aussi appelés pois protéagineux [2, 3].

Les graines de pois sont riches en protéine, en sucres solubles, en fibres, en minéraux et en vitamines (Tableau 1.1). Le pois, comme d'autres légumineuses, accumule également des substances naturelles bénéfiques pour la santé humaine [46]. Les effets observés sur les maladies, notamment les maladies cardiovasculaires, le diabète et autres, peuvent être le résultat de la combinaison synergique de ses composés bioactifs, tels que des phytostérols, des isoflavones, des saponines et des alcaloïdes [47, 29]. De nombreuses études ont montré que ces composés ont des propriétés antimicrobiennes, des effets hypotenseurs, une capacité à réduire le cholestérol, des activités anti-thrombotiques et anti-oxydantes, une aptitude à améliorer l'absorption/biodisponibilité des minéraux, des effets cyto- ou immun-modulateurs et des activités opioïdes [48, 49, 50, 51].

**Tableau 1.1** : Valeur nutritive du pois (par 100g\*) [29].

<b>Elément</b>	<b>Quantité</b>	<b>Unité</b>
Energie	118	kcal
<b>Macromolécules</b>		
Protéines	8,34	g
Lipides	0,39	g
Glucides	21,10	g
Fibres alimentaires	8,3	g
<b>Minéraux</b>		
Calcium	14	mg
Fer	1,29	mg
Magnésium	36	mg
Phosphore	99	mg
Potassium	362	mg
<b>Vitamines</b>		
Vitamine C	0,4	mg
Vitamine B6	0,048	mg
Vitamine E	0,03	mg
Vitamine K	5,0	µg

\*Valeurs basées sur les parties comestibles de graines mûres, cuites, bouillies sans sel.

Les gousses de pois peuvent être aussi valorisées pour la production de l'éthanol et de bio-charbon, la récupération de polysaccharides et d'hydrates de carbone, en plus de leur utilisation comme source de fibres alimentaires [52, 53, 54]. Elles sont constituées de plus de 50% de fibres, 28,2% de glucides, 14,2% de protéines, 4,5% de lipides et 4,5% de cendres qui se composent principalement de K, Mg, Ca, Na, Fe, Zn et Cu [55].

### 1.1.6. Production du pois

#### 1.1.6.1. Dans le monde

Le pois est la 5<sup>ème</sup> légumineuse la plus cultivée dans le monde après le soja, le haricot, l'arachide et le pois chiche. Il est cultivé commercialement dans plus de 100 pays. La production des pois secs se concentre au Canada, en Russie, et en Chine, qui produisent plus de la moitié de la production mondiale. La production au Canada a augmenté considérablement au cours des 20 dernières années, de moins de 2,26 millions de tonnes au début des années 1999 à environ 3,58 millions de tonnes en 2018 [5].

La production des pois secs dans le monde a atteint un pic de 16,6 millions de tonnes en 1990. Depuis, la production mondiale a chuté pour atteindre 13,5 millions de tonnes l'an 2018. A l'échelle continentale, l'Europe est classée en premier lieu en assurant plus de 38% de la production mondiale, suivie par les deux Amériques (33,6%), l'Asie (20,5%), puis l'Afrique (4,6%) et l'Océanie (2,5%). Au niveau africain, et en terme de production de pois sec, l'Ethiopie occupe la première place suivie par la Tanzanie, le Maroc, la Madagascar, le Rwanda et l'Algérie [5].

#### 1.1.6.2. En Algérie

En Algérie, le pois est la légumineuse la plus cultivée. En 2018, le pois frais a occupé une superficie de 35 897 ha, tandis que le pois sec s'est étendu sur 10 383 ha. La production de pois frais a connu une augmentation notable pendant cette dernière décennie, permettant à l'Algérie d'occuper la 6<sup>ème</sup> position à l'échelle mondiale après la Chine, l'Inde, la France, les Etats-Unis et l'Egypte, avec une production de 186 203 tonnes [5].

La culture du pois existe depuis longtemps en Algérie, signalée avant 1830 dans les jardins et les champs en Kabylie [56]. Cette culture a suscité un intérêt particulier auprès des services agricoles pour augmenter les superficies et améliorer les niveaux productifs en quantité et en qualité. Plusieurs variétés de pois frais sont utilisées par les agriculteurs algériens à savoir : la Douce de Provence, l'Expresse à longue cosse, le Petit Provençal, la Merveille de Kelvedon et l'Onward. Toutes ces variétés sont introduites dont les cultivars d'origine locale

restent ignorés et non sollicités [57, 58]. Selon les données du ministère de l'agriculture algérienne de l'an 2015, les pois sont beaucoup plus répandus à l'ouest du pays dans les wilayas de Tlemcen, Relizene, Mostaganem, Mascara, Aïn Témouchent, Sidi Bel Abbès et Chlef [59].

#### 1.1.7. Facteurs limitant la production

Les rendements potentiels de la majorité des productions agricoles sont généralement réduits à cause des contraintes environnementales et biotiques.

##### 1.1.7.1. Stress abiotiques

Le froid, la sécheresse et la salinité sont les stress environnementaux les plus importants pouvant affecter la production du pois. La plupart des cultivars de pois sont très susceptibles au froid et particulièrement les lignées caractérisées par des entre-nœuds longs, d'une grande surface foliaire et des graines ridées [42].

La sécheresse est le deuxième stress abiotique le plus important pour le pois. En outre, une élévation transitoire ou prolongée de la température au-delà d'un seuil défini entraîne une série de réponses morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires modifiées, conduisant à un retard de croissance des plantes et à une perte de rendement [60, 61]. L'aridité et les températures élevées apparaissent ensemble dans plusieurs régions de production de légumineuses, pouvant interagir pour réduire les rendements [9]. De plus, la sécheresse peut arrêter la fixation de l'azote et diminuer la production de biomasse [42].

Le changement climatique est considéré comme l'une des principales menaces pesant sur les productions agricoles dans le monde et ses implications pour la sécurité alimentaire atteignent des niveaux alarmants. L'interaction entre les températures élevées, les changements de la distribution des précipitations et la fréquence et l'intensité des événements météorologiques extrêmes devrait avoir un impact sur les rendements agricoles [62, 63]. Dans une étude de définition d'idéotypes pour adapter le pois au changement climatique, il a été souligné que le changement climatique devrait diminuer la productivité des cultivars de pois actuels et qu'une augmentation de l'irrigation (pour faire face à la distribution des précipitations moins favorable attendue) n'éviterait pas les pertes de rendement [63].

La salinité est aussi un stress défavorable à la culture du pois, causant des pertes variant entre 74 et 100% [64, 65]. Des niveaux critiques du sel ont été établis et des procédures de dépistage sont élaborées pour identifier les déterminants génétiques de tolérance au sel chez le pois. La fixation de l'azote symbiotique est notamment sensible à la salinité élevée [66]. En outre, la présence de métaux lourds peut être nuisible sur les cultures de pois. Il a été démontré que l'accumulation de cadmium dans les feuilles a des effets inhibiteurs sur la photosynthèse et la croissance des plants de pois [67].

#### 1.1.7.2. Stress biotiques

##### a. Ravageurs et parasites

Les insectes comme les pucerons, les thrips et le charançon sont les principaux ravageurs qui peuvent endommager le pois cultivé ainsi que ses graines [68]. Le ravageur le plus dommageable du pois fourrager est le charançon du pois (*Bruchus pisorum*) ; ses larves réduisent le rendement et la qualité de la semence en s'alimentant sur les graines en développement. L'incorporation de la résistance au charançon du pois à partir des espèces sauvages de *P. fulvum* dans le pois semble encourageante [69].

*Orobanche crenata*, plante parasite non chlorophyllienne des racines d'angiospermes qui dépend totalement de son hôte pour son approvisionnement en éléments nutritifs, constitue une contrainte importante pour la production de pois d'hiver dans les pays asiatiques et méditerranéens [70]. Le pois est également affecté par un certain nombre de nématodes tels que *Pratylenchus* spp., *Meloidogyne* spp. et *Heterodera goettingiana* [9].

##### b. Principales maladies bactériennes et virales

Les bactérioses les plus redoutables du pois sont la brûlure bactérienne causée par *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, qui provoque des pertes économiques significatives particulièrement pendant le printemps et l'été, et la maladie des taches brunes causée par *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* [42].

Les maladies virales sont dommageables dans la plupart des régions du monde où les pois sont cultivés. Il y a plus de 50 virus connus pouvant infecter le

pois [11, 68]. Le plus important parmi eux est le virus de la mosaïque du pois (PSbMV : *Pea Seed borne Mosaic Virus*) qui s'est disséminé dans le monde entier par les graines infectées. La maladie est également transmise par les pucerons [11, 42, 71]. Le pois peut également être affecté par d'autres virus, tels que le virus de l'enroulement des feuilles du haricot (BLRV : *Bean Leaf Roll Virus*), le virus de la mosaïque et d'énation du pois (PEMV : *Pea Enation Mosaic Virus*) appelé également le virus 1, la mosaïque du pois provoquée par le virus 2 du haricot (BV2: *Bean Virus 2*), le virus de la mosaïque commune du pois (PCMV : *Pea Commun Mosaic Virus*) et le virus de brunissement précoce du pois (PEBV : *Pea Early Browning Virus*) [42].

### c. Principales maladies fongiques

Les variations en rendement du pois sont souvent associées aux attaques fongiques. Les maladies à craindre sur les récoltes sont surtout celles qui se manifestent par des attaques foliaires et racinaires. L'antracnose du pois fourrager est un complexe de trois espèces fongiques : *Ascochyta pisi*, *Mycosphaerella pinodes*, la forme parfaite d'*A. pinodes*, et *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. Ces espèces sont répandues partout où les pois sont cultivés et sont en particulier dommageables dans les zones douces et humides [68].

L'oïdium du pois causé par *Erysiphe pisi*, est une maladie foliaire très répandue dans le monde [72]. Elle peut causer des dégâts graves si elle se développe tôt dans la saison, avant la floraison. Elle est plus importante dans les régions subtropicales et dans les régions tempérées [11]. La résistance à l'oïdium est exprimée par un gène récessif (*er1*) [73, 74].

La rouille du pois est causée par *Uromyces viciae-fabae* et *U. pisi*. *U. viciae-fabae* est l'agent principal de la maladie dans les régions tropicales et subtropicales, telles que l'Inde et la Chine [75]. Plusieurs autres maladies fongiques peuvent aussi affecter la partie aérienne du pois comme la pourriture blanche causée par *Sclerotinia* spp., la pourriture grise causée par *Botrytis* spp., la septoriose et l'alternariose [68, 75].

Les maladies telluriques sont considérées comme un facteur principal limitant l'augmentation et la stabilisation des rendements du pois [13]. Parmi ces maladies,

selon leur gravité, nous citons la pourriture racinaire causée par *Fusarium solani* f. sp. *pisi* et la fusariose vasculaire causée par *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Fop). La fusariose vasculaire provoquée par Fop a été rapporté dans tous les pays où les pois sont cultivés et peut être particulièrement grave lorsque des rotations courtes des cultures sont pratiquées [76].

## 1.2. La fusariose vasculaire du pois

### 1.2.1. Généralités sur *Fusarium oxysporum*

Le genre *Fusarium* a été décrit par LINK en 1809 pour des champignons ayant des conidies sous forme de canot ou de banane [77]. La base de données Fusarium-ID énumère 78 espèces distinctes de *Fusarium* basées sur le séquençage du gène codant le facteur 1 alpha (EF-1 $\alpha$ ) de la traduction et de l'élongation [78].

L'une des espèces les plus importantes est *Fusarium oxysporum* qui renferme des types pathogènes et non pathogènes [79]. *F. oxysporum* est d'origine tellurique cosmopolite, présentant une très grande diversité génétique et écologique. Cette espèce est également classée cinquième sur une liste, basée sur l'importance scientifique et économique, des 10 principaux agents pathogènes fongiques [80, 81]. Elle renferme plus d'une centaine de formes spéciales et races spécifiques aux plantes hôtes qui sont en majorité d'intérêt horticole, maraicher ou agronomique. *F. oxysporum* inclut également des populations non pathogènes pour lesquelles aucune plante hôte n'a été identifiée [82, 83].

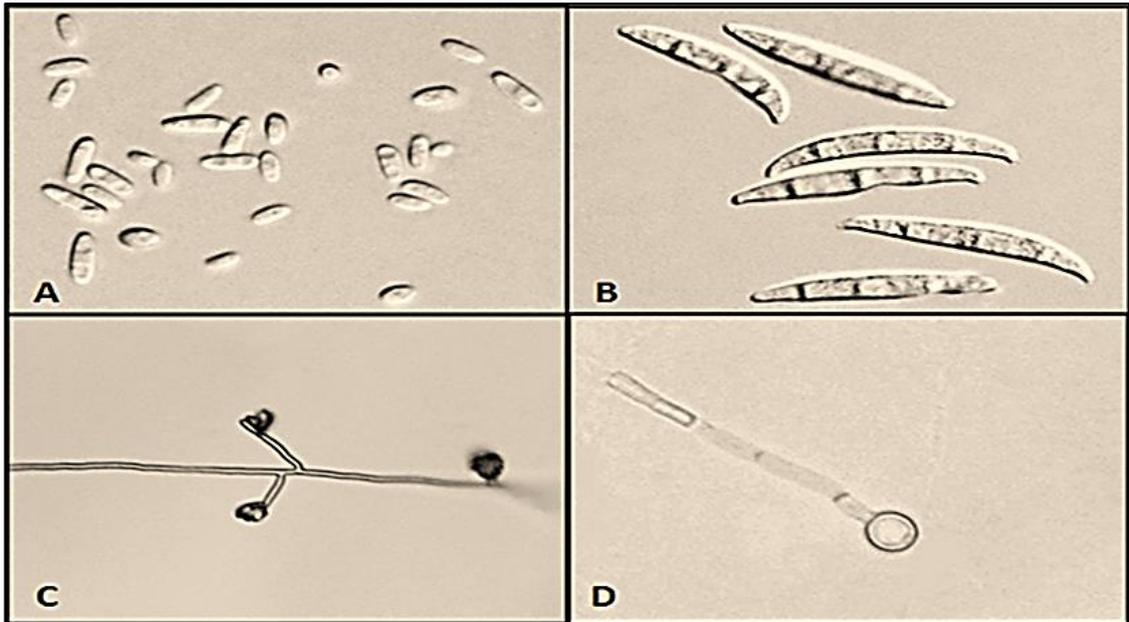
Les espèces phytopathogènes de *F. oxysporum* causent des maladies importantes sur les cultures, en induisant spécialement la fusariose vasculaire [84]. Ce type de trachéomyose affecte plusieurs plantes pérennes et annuelles, aussi bien dans les zones tempérées que dans les zones tropicales [85]. Le haut niveau de spécificité parasitaire des souches pathogènes de *F. oxysporum* a conduit à la détermination de nombreuses formes spéciales (*formae specialis*, f. sp.), permettant de différencier des morphotypes similaires [86]. Chaque forme spéciale peut être divisée en races physiologiques dont chacune est considérée comme un pathotype distinctif en interaction avec des variétés différentielles chez la même espèce végétale [87, 88].

*F. oxysporum* se distingue des autres espèces de *Fusarium* par la production abondante de microconidies, rassemblées en fausse tête à partir de monophialides courtes. Seule la reproduction asexuée est connue chez cette espèce, donc positionnée taxonomiquement au sein des Deutéromycètes [89]. Ainsi, *F. oxysporum* est un Deutéromycète tellurique de la sous classe des Hyphomycètes et de la famille des Tuberculariacées [90, 91, 92]. Historiquement, *F. oxysporum* est décrit par son phénotype asexué en l'absence de formes sexuées, même si plusieurs études ont montré la présence éventuelle d'un cycle sexué dissimulé [93, 94].

### 1.2.2. Caractéristiques morphologiques

*F. oxysporum* est une espèce anamorphe caractérisée par des critères morphologiques comprenant la forme des macroconidies, la structure des microconidiophores et la formation et la disposition des chlamydospores. La taille du génome de ce champignon est estimée entre 18,1 et 51,5 Mb, avec un nombre de chromosomes variant de 7 à 14, incluant les plasmides mitochondriaux linéaires [95].

La taxonomie morphologique des espèces du genre *Fusarium* est basée principalement sur la structure et l'abondance des formes de reproduction asexuée (chlamydospores, phialides, microconidies et macroconidies) et sur des caractéristiques culturelles (texture de colonie, couleur et arôme de la culture) [77]. Ainsi, *F. oxysporum* se caractérise par des microconidies non-cloisonnées formées dans des monophialides courts, des macroconidies à 3 cloisons formées à partir des monophialides sur des conidiophores embranchés dans des sporodochia, et des chlamydospores à paroi lisse ou rugueuse formées séparément ou en paires (Figure 1.2) [77].



**Figure 1.2 :** Caractéristiques morphologiques de *F. oxysporum* [77].

(A) Microconidies; (B) macroconidies; (C) microconidies germées sur des monophialides; et (D) chlamydospore.

### 1.2.3. Processus d'infection

#### 1.2.3.1. Pénétration

*F. oxysporum* peut survivre dans le sol pendant de longues périodes sous forme de chlamydospores, rendant son élimination dans le sol quasi impossible [88]. Les chlamydospores dormantes présentes dans le sol germent sous des conditions favorables et infectent les plantes à travers leurs racines [96]. Après la germination, un thalle se forme à partir duquel des conidies peuvent se développer dans 6 à 7 heures, ainsi que des chlamydospores dans 2 à 3 jours (Figure 1.3) [97].

Initialement, l'hyphe s'attache sur la surface de la racine et se développe le long des jonctions des cellules épidermiques pour former un réseau dense mélangé avec les poils absorbants de la racine. Après la colonisation extérieure, le champignon pénètre directement par les cellules épidermiques. Bien que la pénétration se produit principalement aux extrémités des racines, des pénétrations à des positions aléatoires, le long des poils absorbants, aussi bien que dans les zones méristématiques des racines primaires et latérales ont été rapportées. Cependant, aucune structure spécialisée de pénétration n'a été observée [96].

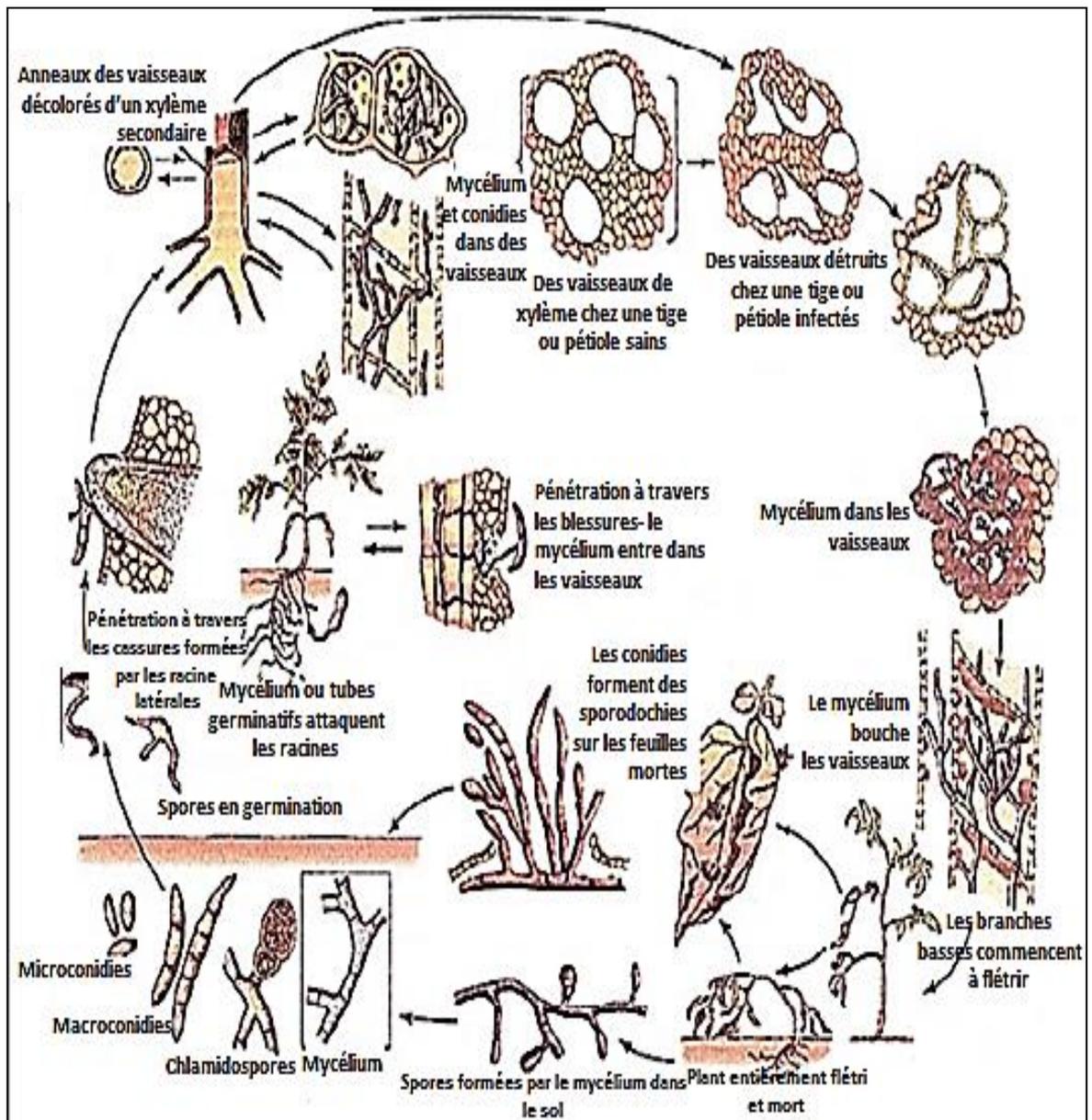


Figure 1.3 : Cycle infectieux de *F. oxysporum* [88].

### 1.2.3.2. Colonisation

Après pénétration, le champignon continue à se développer entre et dans les cellules à travers le tissu de cortex jusqu'à ce qu'il atteigne les vaisseaux du xylème où sa pénétration se produit à travers des creux et d'autres espaces cellulaires pour se confiner dans les vaisseaux du xylème. A ce stade, le champignon initiera sa prolifération en s'infiltrant avec le flux de la sève pour migrer vers la partie supérieure de la plante [96]. Les symptômes caractéristiques de la fusariose vasculaire apparaissent suite au fort stress hydrique provoqué par la prolifération fongique, combinée avec des réactions de défense de l'hôte [88].

### 1.2.3.3. Conservation

Aux stades avancés de l'infection, quand la plante se flétrit et meurt, le champignon passe du mode biotrophe au mode nécrotrophe, en envahissant le parenchyme de l'hôte et en sporulant d'une façon abondante (production de grandes quantités de conidies et de chlamydo-spores) [96]. Le pathogène survit sur les débris des plantes infectées dans le sol sous forme de mycélium et autres formes sporales, mais le plus souvent sous forme de chlamydo-spores dans les régions tempérées plus fraîches [88].

### 1.2.4. Mécanismes parasitaires

#### 1.2.4.1 Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire

Quand ils envahissent les plantes, les champignons phytopathogènes doivent traverser des barrières physiques telles que la paroi cellulaire de la plante, essentiellement composée de polysaccharides et de pectine. Chez *F. oxysporum*, et en raison de l'absence de structures spécialisées, telles que les appressoriums, sa pénétration est liée à la sécrétion des enzymes de dégradation de la paroi végétale (CWDEs : *Cell Wall Degrading Enzymes*). Plusieurs enzymes, comme les exo- et les endo-polygalacturonases, l'endo-xylanase et la pectate-lyase ont été purifiées, caractérisées et clonées chez des isolats phytopathogènes de *F. oxysporum* [96].

#### 1.2.4.2. Production de toxines

*Fusarium* spp. sont connus par leurs aptitudes à produire des métabolites secondaires toxiques pour les plantes : les phytotoxines. L'acide fusarique, un composé d'une toxicité modérée pour les plantes, a été l'un des premiers métabolites fongiques impliqués dans la pathogénèse [98]. Cette toxine non spécifique est produite par plusieurs espèces de *Fusarium* [99]. A de fortes concentrations, il induit plusieurs réactions physiologiques dans la cellule végétale, telles que la perturbation de la croissance cellulaire, de l'activité mitochondriale et de la perméabilité de la membrane plasmique. A de faibles concentrations, il peut déclencher les réactions de défense de la plante et la mort cellulaire programmée [100].

Bien que la relation entre l'acide fusarique et la pathogénèse est discutable, il a été décrit comme le facteur responsable de la pathogénicité de la race 2 de Fop [101]. Outre l'acide fusarique, les isolats de *F. oxysporum* peuvent aussi produire d'autres toxines telles que la beauvericine, l'enniantine B, la bikaverine, la moniliformine, la fumonisine et les trichothécènes qui peuvent aussi contribuer dans le processus de pathogénicité [102].

#### 1.2.4.3. Autres mécanismes

La détoxification enzymatique des phytoalexines, les voies de signalisation par les protéines kinases (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinases*) et les protéines G, le fonctionnement des peroxysomes, les facteurs multiples de transcription et les protéines effectrices sont des mécanismes qui sont impliqués dans le processus d'infection des plantes par *F. oxysporum* [85, 103].

Le gène *Fmk1* codant pour une MAPK et sa cible principale le facteur de transcription *Ste12* ont été isolés chez *F. oxysporum*. La signalisation par les MAPK est impliquée dans l'adhésion des spores à la surface des racines, le développement de l'hyphe de pénétration, la croissance invasive et la production de la pectate lyase [104, 105].

#### 1.2.5. Races de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*

La fusariose vasculaire du pois a été décrite la première fois et distinguée de la pourriture racinaire par JONES et LINFORD qui l'ont appelée « la maladie du flétrissement méconnu ». À ce moment, la maladie a été signalée à Wisconsin aux Etats-Unis, où elle a causé des pertes économiques plus importantes que celles rapportées pour la pourriture racinaire [106]. L'agent causal a été appelé *F. othoceras* var. *pisi* [107].

Le pathogène a été dénommé plus tard race 1 de *F. oxysporum* f. sp. *pisi* en 1935 [108]. En 1933, SNYDER a décrit une autre race de *F. oxysporum* capable de causer le flétrissement chez des variétés résistantes à la race 1, et qui a été dénommé race 2 [109]. Cette nouvelle race apparaît plus tard dans la période de végétation, souvent seulement durant le développement des gousses [110]. Les races 3 et 4 ont été ensuite décrites aux Pays Bas et au Canada, respectivement [13]. Cependant, ces deux races ont ensuite été regroupées dans la race 2 étant

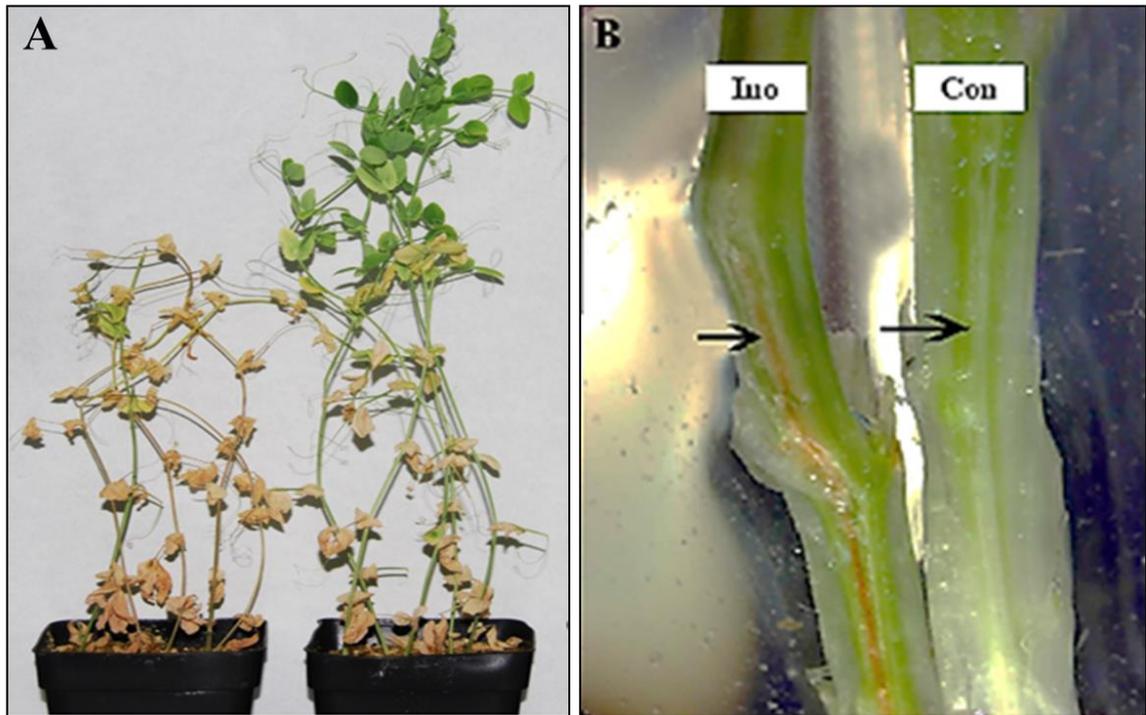
des formes dérivées plus virulentes de la race 2. En 1970, la race 5 a été décrite au nord-ouest de Washington (Etats Unis), où tous les cultivars commerciaux connus résistants aux races 1 et 2, étaient attaqués [111].

En 1979, une nouvelle race de Fop a été décrite à l'ouest de Washington, qui était pathogène sur des cultivars et des lignées améliorées résistants aux races 1, 2 et 5, et dénommée la race 6 [112]. Quatre races de Fop sont identifiées, les races 1 et 2 décrites dans le monde entier, alors que les races 5 et 6 sont seulement importantes à l'ouest de Washington [14]. Depuis, pas de nouveautés sur l'évolution et le développement des races de ce pathogène.

#### 1.2.6. Symptômes de la maladie

Les symptômes dus aux races 1, 5 et 6 provoquent l'enroulement des feuilles et des stipules vers le bas, l'épaississement de l'entre-nœud basal, le jaunissement et les nécroses des feuilles et les tiges deviennent plus fragiles (Figure 1.4A) [113]. Bien que le système racinaire apparaisse normal, le tissu vasculaire de la racine et de la tige peut devenir jaune à orange. Cette décoloration s'étend souvent à la tige supérieure (Figure 1.4B). Durant le développement de la maladie, le jaunissement progresse des feuilles inférieures vers l'apex de la tige. La fusariose se développe rapidement entraînant la mort des plantes [114].

Les symptômes de la race 2, sur les plantes individuelles, sont semblables aux symptômes d'autres races de Fop. En plein champ, les apparences sont occasionnelles, sauf si la densité de l'inoculum est très élevée. Habituellement, en croissance avancée et à la floraison, les symptômes deviennent plus apparents. Dans le cas de la race 2, la décoloration est plus intense allant de l'orange au rouge foncé [11].



**Figure 1.4** : Symptômes de la fusariose vasculaire du pois [114, 115].

(A) Jaunissement et flétrissement des feuilles, (B) décoloration des tissus vasculaires infectés (Ino) par rapport au tissu non infectés (Con).

#### 1.2.7. Epidémiologie

Fop peut survivre dans le sol pendant plus de 10 ans en absence de son hôte sous forme de chlamydospores à paroi épaisse. La survie est liée à l'association du champignon avec les racines des plantes non-hôtes. Le champignon est également capable d'infecter les graines. De plus, *F. oxysporum* peut être transporté par les outils agricoles et les débris végétaux et dispersé par le vent ou par les eaux d'irrigation. Après sa nouvelle installation, souvent une période de latence, allant jusqu'à quelques années, précède le déclenchement des cycles infectieux et épidémiques [11]. Une température du sol de 21 à 25 °C est généralement plus favorable pour que Fop puisse initier son cycle infectieux, bien que la race 5 peut infecter les plantes hôtes en basses températures [11, 116].

#### 1.2.8. Méthodes de lutte contre la maladie

Le contrôle des agents phytopathogènes est principalement basé sur trois stratégies : les pratiques culturales, l'application des produits agrochimiques et l'utilisation des variétés résistantes [117].

#### 1.2.8.1. Lutte culturale

La rotation des cultures est la meilleure conduite culturale qui peut contribuer à la réduction des dégâts causés par les phytopathogènes fongiques. Cependant, l'effet reste mineur dans la résolution des problèmes de pois causés par la fusariose vasculaire, non seulement parce que les chlamydospores de *Fop* survivent très longtemps dans le sol, mais aussi parce que l'inoculum peut se multiplier sur les racines des hôtes porteurs asymptomatiques [118].

La solarisation peut détruire relativement les pathogènes telluriques mais aussi augmente la disponibilité du microbiote bénéfique du sol [119]. De plus, les agents pathogènes du sol peuvent être également contrôlés par l'élimination des résidus végétaux de la culture affectée par la fusariose, ce qui empêche la formation de chlamydospores et limite la gravité de la maladie sur la culture suivante [120].

#### 1.2.8.2. Lutte chimique

Les sols infestés par *F. oxysporum* peuvent être traités en diminuant l'inoculum initial pour réduire son potentiel infectieux. La fumigation du sol avec un fongicide à large spectre peut assurer un contrôle préventif relatif, bien que la recolonisation du sol par *Fop* se déroule très rapidement [118]. Cette technique reste coûteuse, voire impossible, en cas d'application en plein champ. De plus, en raison de l'impact négatif des produits chimiques sur les organismes non cibles, l'environnement et la santé, la gamme et le taux des fongicides utilisés ont été progressivement limités, dont certains d'entre eux ont été éliminés [121].

Les composés agrochimiques sont variés, mais leur efficacité reste relativement très limitée en raison des attaques telluriques et les migrations vasculaires. Un mélange de bénomyl et de thirame utilisé pour le traitement des semences a été prouvé efficace. L'ajout de minéraux dans le sol comme le bore (Bo), le zinc (Zn), le manganèse (Mn) et le bromure de méthyle (CH<sub>3</sub>Br) peut diminuer la gravité des fusarioses vasculaires [122].

### 1.2.8.3. Lutte biologique

Durant ces dernières années, le contrôle biologique de la fusariose vasculaire a montré des résultats encourageants. Le biocontrôle consiste à utiliser des champignons antagonistes tels les souches non pathogènes de *F. oxysporum*, de *Trichoderma* spp. et de *Gliocladium* spp., et des bactéries telles que *Pseudomonas fluorescens* et *Burkholderia cepacia* [123, 124, 125, 126, 127].

Bien que les bioproduits soient généralement des outils importants pour une gestion plus durable des maladies et représentent des alternatives ou compléments précieux aux pesticides classiques, ils ne représentent en pratique qu'une proportion relativement faible, moins de 10% du marché mondial des produits phytosanitaires [128].

### 1.2.8.4. Lutte génétique

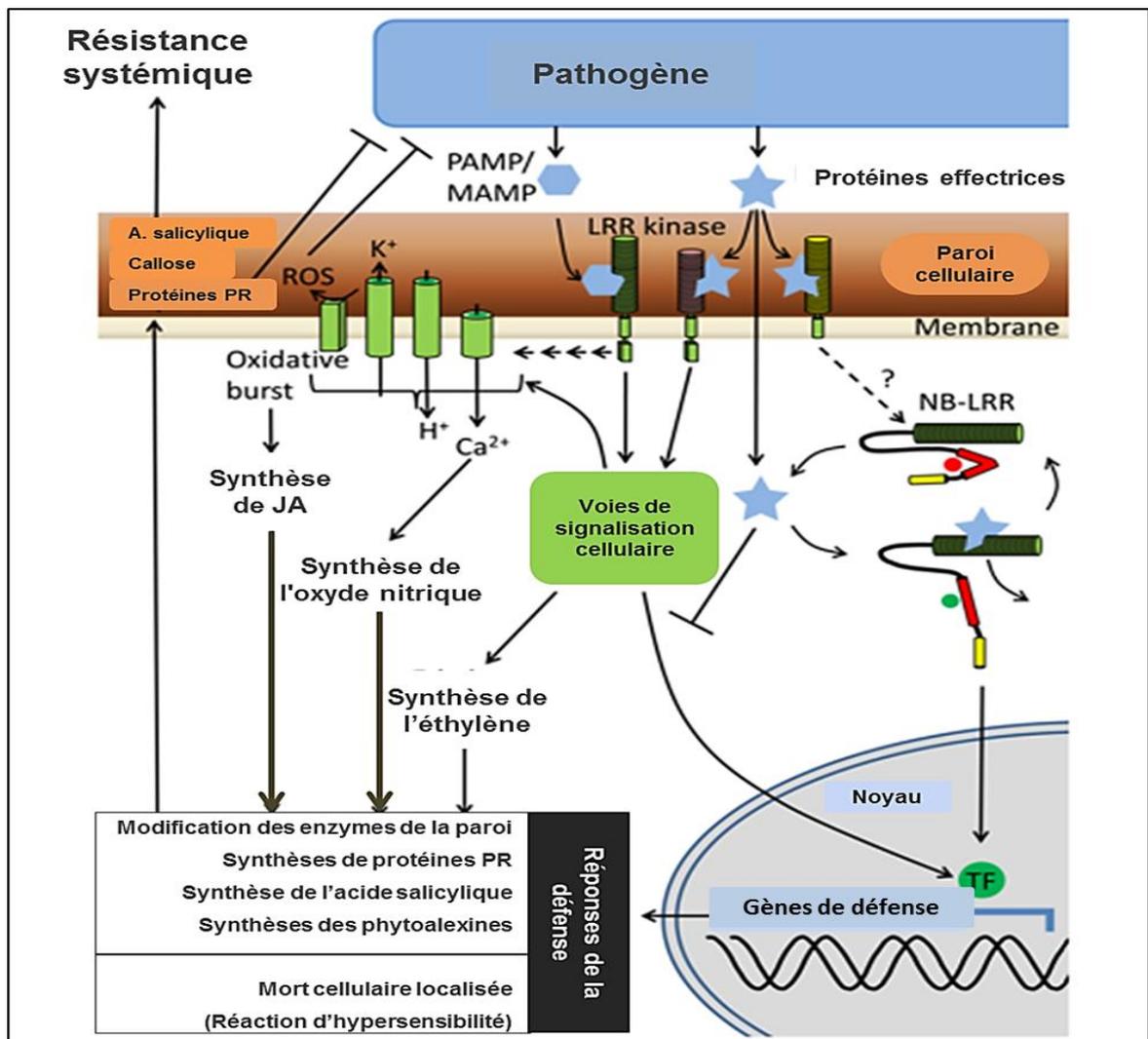
L'utilisation des variétés résistantes du pois a été considérée comme la principale mesure pratique et économique pour contrôler la maladie en plein champ. La résistance aux quatre races de Fop est contrôlée par des gènes dominants et héréditaires. La résistance à la race 1 est contrôlée par un seul gène dominant (*Fw*) qui est intégré dans la plupart des variétés cultivées [129]. La résistance à la race 2 est aussi conférée par un gène dominant *Fwn*, bien qu'il a été démontré que plusieurs gènes peuvent être impliqués [11, 14]. La résistance à la race 5 est contrôlée par le gène dominant *Fwf* localisé sur le groupe de liaison II près du marqueur RAPD "U693a" [130, 131].

La résistance génétique des plantes est une alternative clé pour lutter contre les maladies et les ravageurs des cultures. Cependant, les agents pathogènes s'adaptent fréquemment à la résistance génétique et la surmontent, en particulier lorsqu'elle est déterminée par des gènes majeurs. Ainsi, la résistance quantitative a gagné un intérêt ces dernières années pour relever le défi majeur de la durabilité de la résistance génétique [132].

## 1.3. Résistance des plantes face aux maladies parasitaires

Les attaques des d'agents phytopathogènes déclenche des réponses défensives chez la plante. Il s'agit de réactions cellulaires complexes et

multiformes, impliquant des événements histologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires, qui agissent individuellement ou ensemble pour limiter la propagation du pathogène et la manifestation de la maladie. La réponse des plantes aux premiers stades de l'infection fongique implique la mort cellulaire, la production de métabolites secondaires antimicrobiens, des molécules de signalisation, y compris les phytohormones et les espèces réactives de l'oxygène (ROS : *Reactive Oxygen Species*), avec des dépôts de callose et modification de la paroi cellulaire (Figure 1.5) [133].



**Figure 1.5 :** Vue globale de l'interaction plante-pathogène [134].

(PAMP) motif moléculaire associé au pathogène, (MAMP) motif moléculaire associé au microorganisme, (NB-LRR) liaison nucléotidique-répétition extracellulaire riche en leucine, (JA) acide jasmonique et (TF) facteurs de transcription.

Les plantes utilisent ce type de réponses aux différents agents pathogènes, néanmoins l'ampleur et la vitesse de production des différents composés associés varient selon les interactions spécifiques hôte-pathogène, dont certaines réponses peuvent contribuer dans le processus de la résistance [135].

### 1.3.1. Résistance quantitative

#### 1.3.1.1. Résistance incomplète *versus* résistance complète

Historiquement, la résistance a été différenciée en deux grandes catégories: la résistance incomplète fournie par les gènes de résistance quantitative et la résistance complète contrôlée par les protéines de résistance (R) [136, 137].

Les gènes conférant une résistance dominante, envers les pathogènes, codent pour des protéines impliquées dans la reconnaissance spécifique de la race du pathogène. La relation gène pour gène s'accorde à une forte résistance codée par les gènes *R*, envers les pathogènes exprimant des gènes d'avirulence (*avr*) correspondants [138]. Les gènes *R* codent pour des protéines riches en leucine (LRR : *Leucine-Rich-Repeat*) menées d'un site de perception du pathogène [139]. Le signal reconnu par une protéine R peut assumer diverses formes, telles que des protéines effectrices, des activités enzymatiques de ces protéines ou des métabolites polyketides [138, 140]. En contraste avec la forte résistance codée par un seul gène *R*, la résistance de l'hôte souvent oligo- ou polygénique, rapportée à une résistance horizontale ou quantitative, est identifiée par des locus multiples à traits quantitatifs (QTL : *Quantitative Trait Loci*) [141].

La résistance quantitative peut se référer à un niveau incomplet ou partiel du phénotype de résistance. Elle peut également se référer à une distribution continue entre phénotypes résistants et sensibles dans une descendance, résultant le plus souvent de la ségrégation d'allèles avec des effets variables à plusieurs locus. En revanche, la résistance qualitative fait référence à un niveau de résistance complet ou élevé, ou à une ségrégation bimodale des phénotypes dans une descendance, classant les individus en deux catégories distinctes: résistants et sensibles [132].

### 1.3.1.2. Phénotype de la résistance quantitative

La résistance quantitative se réfère à une résistance conduisant à une réduction de la maladie, mais pas à son absence totale [136, 142, 143]. En tant que caractère quantitatif, ce type de résistance est contrôlé par plusieurs gènes pouvant interagir avec l'environnement et les uns avec les autres. Il a été montré que les effets cumulatifs de nombreux locus peuvent entraîner des niveaux élevés de résistance [144, 145]. De ce fait, la résistance quantitative désigne toute résistance incomplète d'un génotype végétal face à un agent pathogène [146]. Cette résistance peut être aussi appelée résistance partielle ou horizontale [147, 148].

Phénotypiquement, la résistance quantitative présente une distribution continue des caractères qui ne correspondent pas aux ratios mendéliens de ségrégation. Ceci s'oppose au caractère qualitatif, dans lequel la variation est généralement due à des différences au niveau d'un locus [136, 142].

La résistance inductible chez les plantes contre les agents phytopathogènes est un processus en trois étapes: (1) la reconnaissance d'un organisme potentiellement hostile; (2) la transduction du signal pour transmettre des informations sur une éventuelle attaque et (3) les réponses de défense pour que la plante hôte minimise les dommages causés par le pathogène [149]. De plus, la résistance spécifique peut impliquer des défenses préformées telles que des barrières structurelles et des métabolites secondaires [150, 151, 152]. L'augmentation de la vitesse, de la force ou de l'efficacité de l'un de ces éléments de défense contribue à la résistance qui peut être durable si les agents pathogènes sont incapables de s'y adapter facilement [153].

Chez le pois, la résistance génétique partielle, associée aux mécanismes de la résistance quantitative, a été décrite pour plusieurs parasites et agents phytopathogènes, tels que *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* [154], *Uromyces pisi* [155], *Orobanche crenata* [156] et *Fusarium oxysporum* [20].

### 1.3.1.3. Génomique de la résistance quantitative

Plusieurs gènes contrôlent généralement la résistance quantitative et sont associés à des régions génomiques ou QTL qui contribuent, chacun avec un effet

variable, au phénotype de résistance à un pathogène donné. La résistance quantitative confère souvent un niveau partiel de résistance à la plante, ne permettant pas le contrôle absolu de l'infection, mais réduit la multiplication des pathogènes et limite leur pouvoir de colonisation, ainsi que la gravité des symptômes. Cependant, une combinaison de résistance QTL aux effets puissants peut conduire à une résistance totale dans certains cas [157].

Les QTL de résistance peuvent être spécifiques ou non spécifiques à une espèce pathogène. Certains QTL peuvent conférer une résistance à plusieurs agents pathogènes [158, 159]. En effet, ces gènes codent pour des protéines ayant un rôle dans la reconnaissance des pathogènes, la transduction du signal, la défense et le métabolisme de l'hôte. Des gènes, des protéines et des métabolites régulés par une résistance quantitative en réponse à une infection pathogène ont également été identifiés. Des protéines et des métabolites liés à la résistance impliqués dans les activités antimicrobiennes, de dégradation des toxines et de renforcement de la paroi cellulaire ont été identifiés chez plusieurs espèces végétales [132, 160].

La résistance quantitative est généralement plus durable que la résistance qualitative, vu que les souches pathogènes virulentes surmontent rapidement les gènes *R* [161, 162]. Cette durabilité accrue de la résistance quantitative pourrait être due à différents paramètres [163, 164]:

- l'effet de résistance partielle exerçant une faible pression de sélection sur les populations pathogènes ;
- une combinaison de pressions de sélection contradictoires sur l'évolution des pathogènes ;
- une faible probabilité de mutations pathogènes multiples nécessaires pour surmonter plusieurs QTL ;
- une combinaison de différents mécanismes associés à la résistance qui, ensemble, sont plus difficiles à surmonter ;
- une combinaison de mécanismes de résistance agissant successivement à différents stades du cycle biologique du pathogène ou tout au long du développement de la plante.

Néanmoins, des études évolutives expérimentales menées en passant successivement un pathogène sur des plantes porteuses de résistance quantitative, suggèrent que les champignons et les virus peuvent encore éroder ce type de résistance [165, 166, 167]. En effet, la dégradation ou l'érosion de la résistance quantitative ou de la résistance QTL par des souches pathogènes a été observée également dans des conditions naturelles. Les études de ces systèmes ont permis de mieux comprendre les processus d'adaptation des agents pathogènes impliqués [168, 169, 170, 171, 172].

#### 1.3.1.4. Avantages de la résistance quantitative

Vu que plusieurs gènes contrôlent ce type de résistance, la pression évolutive sur les agents pathogènes est considérablement diminuée. La résistance quantitative peut donc être une bonne source de résistance durable, une résistance qui reste efficace pendant une longue période. En effet, plusieurs gènes contrôlant cette résistance sont utilisés dans les programmes d'amélioration sans enregistrer une augmentation de virulence des agents pathogènes [173, 174].

En outre, la résistance quantitative est plus efficace contre les phytopathogènes nécrotrophes que la résistance qualitative. Cette dernière entraîne fréquemment une mort cellulaire connue sous le nom de réaction d'hypersensibilité (HR : *Hypersensitive Response*). La HR limite la croissance et la colonisation des agents pathogènes biotrophes et conduit généralement à une résistance totale contre ces agents. Cependant, des pathogènes nécrotrophes, qui se nourrissent de tissus morts, exploitent cette mort cellulaire pour augmenter leur propre virulence. Contrairement à la résistance qualitative, la résistance quantitative constitue un moyen efficace de contrôle des pathogènes biotrophes et nécrotrophes [175].

De nombreux locus impliqués dans la résistance quantitative sont efficaces contre plusieurs races d'un pathogène donné, offrant une résistance à large spectre, ou sont efficaces contre plusieurs pathogènes [173]. De plus, la résistance quantitative est efficace face à plusieurs groupes de microorganismes (bactéries, champignons, virus et nématodes) et face aux agents pathogènes qui

infectent différentes parties à différents stades de développement de la plante [136].

### 1.3.2. Mécanismes de résistance chez les plantes

#### 1.3.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les cellules végétales produisent des espèces toxiques d'oxygène réactif (ROS), comme sous-produits de leur métabolisme primaire, tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) et le radical hydroxyle (OH). Les ROS peuvent agir en amont et/ou en aval selon diverses cascades de signalisation. Le niveau de leur accumulation détermine leur rôle dans la cellule car elles pourraient agir comme des molécules importantes de transduction du signal (à de faibles niveaux) ou comme des molécules toxiques (à des niveaux élevés) avec un fort pouvoir oxydant [176, 177]. La production d' $O_2^-$  et de  $H_2O_2$  est connue pour être impliquée dans les mécanismes de défense des plantes, ainsi que dans les processus de leur croissance et développement et dans la réponse au stress abiotiques [178, 179].

Une des premières réactions de défense de la plante à une attaque parasitaire est le «burst oxydatif», qui génère une production localisée et transitoire de ROS, qui semble être une caractéristique commune de la réponse chez les plantes [180]. La production des ROS a été signalée chez plusieurs interactions des plantes avec des bactéries avirulentes, des champignons et des virus [181].

Les ROS peuvent agir comme des molécules antimicrobiennes, des agents réticulant la paroi végétale pour bloquer la pénétration des agents pathogènes et comme des messagers secondaires locaux et systémiques pour déclencher des réponses immunitaires supplémentaires, telles que l'expression des gènes ou la fermeture des stomates [182, 183, 184].

L'excès de production des ROS dans la cellule végétale entraîne des dommages oxydatifs, favorisant ainsi la peroxydation des lipides et endommageant les macromolécules telles que les pigments, les protéines, les acides nucléiques et les lipides [181]. Pour maintenir l'équilibre redox des cellules lors d'un stress, les plantes impliquent des antioxydants, tels que l'ascorbate, le glutathion, les composés phénoliques et les enzymes piégeant les ROS (la

superoxyde dismutase et la catalase) [185, 186, 187]. Chez des cultivars de pois résistants à l'oïdium, une activité importante de la superoxyde dismutase et de la catalase, a été enregistrée [188].

#### 1.3.2.2. Les barrières structurelles

Aux stades pré-vasculaires et vasculaires de l'infection, les plantes répondent à l'invasion fongique par l'activation des mécanismes de défense qui incluent la production du dépôt de callose, l'accumulation des composés phénoliques et la formation de tyloses (excroissances des cellules parenchymateuses du xylème) [189].

Le premier moyen de défense de la plante contre de nombreux pathogènes est présenté par le réseau de macromolécules de la paroi cellulaire de l'hôte. Si cette barrière est surmontée, la cellule tente de limiter la propagation de l'infection par plusieurs moyens. La réponse la plus commune est la formation d'appositions de la paroi cellulaire qui a été montrée pour être rapidement induite après le début de la pénétration des champignons, parfois après quelques heures seulement. Ces appositions, appelées papilles, comprennent une matrice de callose incorporée avec la cellulose, la subérine, le calcium et le silicium [190].

Dans un premier stade d'hydrolyse de la paroi cellulaire, des mécanismes physiques sont impliqués, en utilisant la lignine et des composés phénoliques de la paroi pour restreindre l'action des CWDEs du pathogène sur la paroi cellulaire de l'hôte. Un deuxième mécanisme chimique se produit à un stade ultérieur pour éviter la production de CWDEs par l'agent pathogène. Cette inhibition est liée à la participation des phénols estérifiés dans la paroi cellulaire [190, 191].

Les barrières structurelles naturelles, telles que l'endoderme des racines ou celles créées par la production et l'accumulation des gels et de tyloses vasculaires par les cellules adjacentes du parenchyme et leur accumulation dans les vaisseaux du xylème, peuvent bloquer la progression des hyphes des champignons phytopathogènes, y compris *F. oxysporum* [88, 192].

### 1.3.2.3. Les protéines liées à la pathogenèse

La biosynthèse et l'accumulation de protéines inductibles liées à la pathogenèse (protéines PR: *Pathogenesis-Related Proteins*) est l'une des principales réponses de défense biochimique des plantes à l'infection parasitaire. Ces protéines, de faible poids moléculaire (6 à 43 kDa), sont fortement résistantes à la dégradation protéolytique et aux faibles valeurs du pH, permettant leur survie dans des milieux hostiles tels que le compartiment vacuolaire ou les espaces intercellulaires [193]. Les protéines PR se trouvent dans presque tous les organes, y compris les racines, les fleurs et les tiges avec des niveaux d'abondance maximaux dans les feuilles [194].

Les protéines PR sont fortement induites par les infections. Leur expression et leur accumulation sont liées au type d'agent pathogène et à la nature des tissus végétaux infectés. Elles sont produites sur le site d'infection, les tissus environnants et les tissus systémiques plus éloignés du site infecté. La production dans les parties non infectées protégera les plantes d'une nouvelle infection [133].

Plusieurs familles de protéines PR, dont les protéines PR-1 et PR-2 ( $\beta$ -1,3-glucanases), les protéines PR-3 et PR-4 (chitinases), les protéines de type thaumatine et osmotines (PR-5), les peroxydases (PR-9), les défensines (PR-12) et la thionine (PR-13), présentent des activités antifongiques qui ont été principalement démontrées par des études *in vitro* suggérant leur implication dans la défense des plantes. Etant donné que les  $\beta$ -1,3-glucanes et les chitines sont les principaux constituants de la paroi cellulaire fongique, une co-induction pour une expression coordonnée de la  $\beta$ -1,3-glucanase et de la chitinase après infection a été rapportée chez de nombreuses espèces végétales [195].

L'analyse protéomique dans le cas d'infection du cultivar sensible du pois « Livioletta » par *Peronospora viciae*, a révélé une augmentation significative de l'abondance de la protéine PI176 induite par le pathogène, la protéine ABR17 liées aux stress, une protéine de liaison à ARN riche en glycine, trois protéines photosynthétiques ainsi que des glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénases cytosoliques et chloroplastiques dans les feuilles infectées [196]. La plupart des protéines identifiées lors d'une étude protéomique du pathosystème *P. sativum-Uromyces pisi*, correspondaient à des enzymes impliquées dans la

photosynthèse, le métabolisme, la biosynthèse et la défense, dont le comportement était différent en fonction de la sensibilité/résistance des génotypes étudiés. Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que les plantes pourraient réduire leur photosynthèse et autres métabolismes énergétiques pour améliorer la production de protéines liées à la défense pour faire face aux stress [197].

#### 1.3.2.4. Rôle des phytohormones

La biosynthèse et la signalisation des phytohormones sont importantes pour moduler la réponse des plantes aux pathogènes. Les rôles interactifs de l'acide jasmonique (JA), de l'éthylène (ET) et des acides salicyliques (SA) dans la signalisation de défense et la réponse immunitaire des plantes sont bien confirmés [133]. Cependant, la contribution importante d'autres phytohormones telles que l'acide abscisique (ABA), l'acide gibbérellique (GA), les auxines, les cytokinines et les brassinostéroïdes dans la régulation de la réponse de défense des plantes, a été mise en évidence [198].

L'infection par certains pathogènes induit la synthèse de JA et ET suivie par l'activation de leurs voies de signalisation. L'infection par des champignons nécrotrophes favorise la production d'ET dans la plante hôte [133]. Les composants moléculaires des voies de réponse ET et les facteurs impliqués dans leur régulation contribuent aux réponses immunitaires des plantes à l'infection par des nécrotrophes. De nombreux composants de la voie de réponse ET sont connus pour avoir une fonction de défense contre les nécrotrophes où la perte par mutations fonctionnelles a conduit à des manifestations de la maladie [199, 200].

L'analyse protéomique des cultivars de *P. sativum* infectés par le virus de la mosaïque transmis par la semence (PSbMV : *Pea Seed-Born Mosaic Virus*), a montré une augmentation significative de la biosynthèse des acides aminés, du métabolisme des glucides et de la signalisation redox, mais aussi une augmentation des niveaux de JA ainsi que des niveaux et de l'activité de la lipoxygénase [201].

### 1.3.2.5. Les phytoalexines

#### a. Historique

À l'origine, le concept des phytoalexines en tant que composés antimicrobiens a été suggéré pour la première fois dans les années 1940 sur la base d'une étude de l'infection de *Solanum tuberosum* par l'oomycète *Phytophthora infestans* [202]. Sans connaître les substances distinctes, les phytoalexines ont été déterminées comme des composés chimiques inhibiteurs qui ne sont activés qu'en présence de l'agent pathogène dans des cellules hôtes vivantes proches du site d'infection [203, 204, 205]. De plus, la toxicité des phytoalexines, envers les agents pathogènes, a été décrite comme non spécifique. Cependant, la sensibilité des agents pathogènes aux phytoalexines est variable [206].

La première phytoalexine, la pisatine, a été isolée de *Pisum sativum* infecté par *Sclerotinia fruticola* et sept autres champignons phytopathogènes facultatifs et obligatoires [207]. La synthèse des phytoalexines antifongiques a été ensuite observée chez d'autres plantes hôtes (*Phaseolus vulgaris* et *Capsicum frutescens*). La pisatine a été déterminée comme composé propre à *P. sativum*, indiquant des différences spécifiques à l'espèce dans l'accumulation de phytoalexine [206]. De nombreuses analyses physiologiques et biochimiques ultérieures des interactions plantes/pathogènes ont révélé que le spectre des phytoalexines accumulées en réponse à divers pathogènes fongiques et bactériens dépend fortement des espèces ou familles végétales [203, 208].

#### b. Modulation et voies de biosynthèse

Les phytoalexines sont dérivées de voies métaboliques centrales interconnectées, qui peuvent être distinguées en 3 types de métabolisme : alcaloïde, isoprénoïde (terpénoïde) et phénylpropanoïde [205, 209]. Ces voies métaboliques forment différentes classes de phytoalexines selon les précurseurs basaux ou les conversions enzymatiques ultérieures le long des sections métaboliques. Par conséquent, bien que les phytoalexines produites par différentes espèces végétales au sein d'une même famille soient en général étroitement liées, leur spectre et leur quantité peuvent fortement varier entre les espèces végétales [206].

Les métabolites phénylpropanoïdes sont basés sur des modifications de l'acide aminé aromatique phénylalanine et sont donc dérivés de la voie shikimate. La conversion initiale de la phénylalanine en acide cinnamique intermédiaire est catalysée par la phénylalanine ammoniac-lyase (PAL). En fonction des conversions ultérieures, des métabolites fonctionnellement divers peuvent être formés, y compris des acides (hydroxy) benzoïques, tels que le salicylate, qui peuvent cependant être directement dérivés du chorismate. Alternativement, l'acide cinnamique peut être converti en acide coumarique par la cinnamate-4-hydroxylase. L'acide cinnamique peut être encore modifié en acide caféique, acide férulique et acide sinapique (hydroxycinnamates), qui peuvent finalement (*via* les intermédiaires aldéhydiques) être transformés en leurs alcools (monolignols) [206].

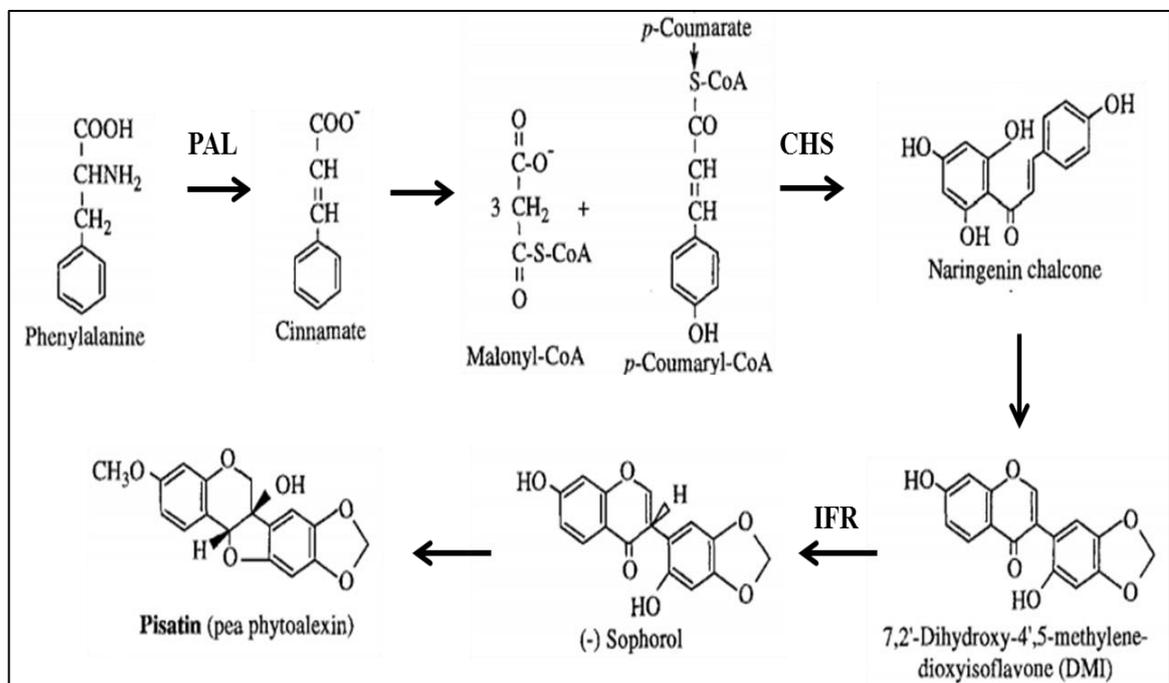
Les phytoalexines phénylpropanoïdes peuvent également être dérivées de phénols simples par addition d'un autre cycle benzénique (cyclisation de trois résidus d'acide malonique) *via* la stilbène synthase (STS) ou la chalcone synthase (CHS) conduisant respectivement à des stilbènes ou des flavonoïdes [205]. La formation de composés flavonoïdes résulte de plusieurs réactions enzymatiques ultérieures impliquant par exemple la chalcone isomérase, la chalcone réductase, la flavone 3-hydroxylase, la flavone synthase, la flavonol synthase et la 2-hydroxyisoflavonone synthase [210]. Les phytoalexines flavonoïdes sont produites chez plusieurs espèces végétales telles que la luzerne (médicarpine, sativane), le haricot (kievitone, phaseolline), le riz (sakuranetine), le soja (glycéollines) et le pois (maackiaïne, pisatine) [211, 212].

### c. Les phytoalexines chez les légumineuses

Les Légumineuses comprennent de nombreuses espèces comestibles, telles que le soja (*Glycine max*), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la luzerne (*Medicago sativa*), l'arachide (*Arachis hypogaea*) et le lupin (*Lupinus angustifolius*). Sous un stress biotique, les plantes de cette famille produisent des phytoalexines appartenant principalement aux différentes classes d'isoflavones [213, 214]. Chez les espèces du genre *Medicago*, les composés ptérocarpans (médicarpine, vestitol, vestitone et sativan) sont synthétisés en réponse à une infection fongique ou bactérienne ou à une élicitation d'ions

métalliques [214, 215, 216]. Les phytoalexines du soja sont des ptérocarpans prénylés (les glyceollins), alors que dans le lupin ce sont la wightéone et la lutéone [213, 214, 217, 218]. Chez le pois chiche, les principales phytoalexines sont la médicarpine et la maackiaine, tandis que chez le pois, la pisatine est la phytoalexine majeure [219].

La pisatine (Figure 1.6), un 6a-hydroxyl-ptérocarpane, est relativement unique parmi les ptérocarpans naturels en raison de la stéréochimie (+) de sa liaison 6a-11a C-C [220]. La pisatine est censée être synthétisée *via* deux intermédiaires chiraux, (-)-7,2'-dihydroxy-4',5'-méthylenedioxy-isoflavanone [(-)-sophorol] et (-)-7,2'-dihydroxy-4',5'-méthylenedioxyisoflavanol [(-)-DMDI] [221].



**Figure 1.6** : Schéma simplifié de la biosynthèse de la pisatine chez le pois [222].

(PAL) phénylalanine ammonia-lyase, (CHS) chalcone synthase, (IFR) isoflavone réductase.

Les études sur la biosynthèse de la pisatine ont montré que des intermédiaires énantiomériques sont impliqués dans sa production indiquant que les pois maintiennent toujours la voie biosynthétique de ptérocarpans [221]. Des enzymes telles que la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), la chalcone synthase (CHS) et l'isoflavone réductase (IFR), sont responsables de la régularisation de la biosynthèse de la pisatine (Figure 1.6) [222].

### 1.3.3. Ressources génétiques et amélioration de la résistance chez le pois

#### 1.3.3.1. Ressources génétiques

Auparavant, les ressources génétiques du pois ont été préservées dans des collections au niveau du centre international des recherches agricoles des zones arides (ICARDA : *International Center for Agricultural Research in Dry Areas*) à Alep, en Syrie. Depuis l'an 2000, aucun centre international n'existe pour regrouper tout le matériel génétique du pois. Cependant, un inventaire a été réalisé en 2013 en identifiant 98 947 entrées réparties sur 28 banques de gènes, composées de races locales (38%), de cultivars commerciaux (34%), de stocks mutants (5%) et de lignées améliorées (13%). Sur ces 98 947 entrées, seules 1876 (2%) sont des espèces apparentées aux pois sauvages [8, 224].

Actuellement, les principales collections du matériel génétique du pois sont conservées par 10 différents centres et instituts à travers le monde [223] :

- L'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INARE, France) : 8 839 entrées.
- La banque génomique des graines en Australie (AGG : *Australian Grains Genebank*) : 7 432 entrées.
- L'Institut Vavilov en Russie : 8 203 entrées.
- Le département de l'agriculture des États-Unis (USDA : *US Department of Agriculture*) : 6 827 entrées.
- L'ICARDA : 6 105 entrées.
- L'institut Leibniz des recherches sur la génétique des plantes en Allemagne : 5 343 entrées.
- L'institut de la génétique végétale en Italie : 4 558 entrées.
- L'institut des sciences des cultures en Chine : 3 837 entrées.
- Le Bureau national des ressources phytogénétiques en Inde (NBPGR : *National Bureau of Plant Genetic Resources*) : 3 609 entrées.
- Le *John Innes Center* au Royaume-Uni : 3 006 entrées.

De nombreuses études ont été conduites pour étudier la diversité et les marqueurs génétiques de *Pisum*. Ainsi, plusieurs collections sont analysées *via* des techniques moléculaires, aboutissant à la structuration de collections

fondamentales. Les collections principales de pois analysées au niveau moléculaire et les collections fondamentales formulées, pourraient servir comme kits pour la cartographie des lignées, une stratégie pour accéder au déterminisme des gènes et des régions génomiques étant à la base des caractères désirés [8].

#### 1.3.3.2. Sélection et amélioration génétique

Le pois est l'organisme modèle original utilisé par Mendel dans sa découverte des lois fondamentales de l'hérédité, en constituant la base de la génétique végétale moderne [10]. La facilité de sa culture, sa reproduction par auto-pollinisation et sa richesse en variation génétique ont fait du pois un sujet facile pour la recherche et l'amélioration génétique [225]. Cette dernière a commencé par la domestication et a continué à travers l'histoire. Depuis lors, les sélectionneurs ont découvert et ont présenté de nouvelles lignées pour adapter les plantes indéterminées, grandes, minces, abondantes ou grimpantes avec de petites graines colorées à des plantes à récolte précoce et déterminée avec de grandes graines sans tannins [9].

Les objectifs de l'amélioration du pois varient selon la région de production et l'utilisation finale. Les premiers objectifs communs à toutes les régions et types des produits incluent l'augmentation du rendement, la résistance aux maladies, la qualité supérieure pour l'utilisation finale recherchée et l'adaptation agronomique aux conditions de la production locale [68, 225]. L'amélioration classique a apporté des progrès significatifs de la production végétale et de la qualité des graines. La méthode d'amélioration la plus largement pratiquée est le système d'amélioration de races pures à travers la ségrégation transgressive à partir des croisements, de sélection massale et du système de descendant d'une seule graine. En outre, le backcross est utilisé généralement pour introduire un seul caractère désiré [226]. Par ailleurs, il y a une longue histoire d'amélioration mutationnelle du pois où des agents mutagènes chimiques ou radioactifs ont été utilisés sur les cultivars commerciaux, pour induire des mutations aléatoires le long du génome pour de nouveaux caractères pouvant être utiles dans l'amélioration, tels que l'épaisseur de tige ou la floraison simultanée [227].

Beaucoup de maladies communes du pois peuvent être contrôlées par des gènes simples tels que *er1*, *er2* et *Er3*, conférant la résistance à l'oïdium. L'amélioration des plantes a été extrêmement réussie en combinant plusieurs de ces gènes dans les génotypes végétaux à améliorer [9, 225].

Plusieurs programmes d'amélioration ont visé la caractérisation des QTL responsables de la résistance aux champignons phytopathogènes et aux mauvaises herbes, chez les génotypes sauvages et cultivés du pois. Cependant, l'hybridation intraspécifique et interspécifique permet l'exploitation des gènes d'intérêt des espèces sauvages et non améliorées au profit des espèces cultivées. Tous les génotypes sauvages connus de *Pisum* sont facilement croisés avec les génotypes cultivés [68]. *P. fulvum* est la seule espèce sauvage distincte, qui a été une source utile de résistance aux maladies et aux insectes [68, 228]. La sélection assistée avec les marqueurs moléculaires (MAS: *Marker Assisted Selection*) a été largement utilisée dans les programmes d'amélioration. Cette approche a été initiée au début des années 80. Ces techniques sont devenues applicables, notamment avec la facilité acquise dans leur manipulation ainsi que leurs coûts financiers raisonnables [22, 226].

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1. Etude de comportement de génotypes de pois face à la fusariose vasculaire

Dans le cadre de notre coopération avec l'Institut de l'Agriculture Durable de Cordoue (IAS-CSIC), et sur la base du programme adopté et les priorités de sélection et d'amélioration, nos expérimentations sont planifiées en deux phases :

- La première phase consiste à examiner le comportement d'une collection de 28 génotypes vis-à-vis de quatre souches phytopathogènes de Fop. A la fin de cette phase, les souches les plus virulentes seront sélectionnées et reconduites pour les essais de la deuxième phase.
- La deuxième phase s'intéresse également à l'étude du comportement, mais avec une autre collection plus élargie, composée de 60 génotypes, en interaction avec les deux souches de Fop les plus virulentes, préalablement sélectionnées lors de la première phase.

##### 2.1.1. Matériel biologique

###### 2.1.1.1. Première collection

Les expérimentations de l'étude du comportement sont réalisées avec une première collection composée de 28 génotypes, issus de populations spontanées et de cultivars de *Pisum* spp. Les génotypes appartiennent aux deux espèces *P. fulvum* et *P. sativum*. Cette dernière renferme plusieurs sous-espèces à savoir *sativum*, *arvense*, *elatius*, *jormadi* et *syriacum*. 26 génotypes font partie de la collection de l'IAS-CSIC, tandis que les semences des deux autres génotypes Séfrou et Merveille de Kelvedon, cultivés localement, sont fournies par l'Institut Technique des Grandes Cultures de Sétif (ITGC, Sétif) (Tableau 2.1).

L'évaluation des niveaux de résistance ou de sensibilité du matériel végétal est conduite avec quatre souches de Fop (R1, R2F42, Arg1 et Arg3), fournies par l'IAS-CSIC. La souche R1 est classée en race 1, alors que les souches R2F42, Arg1 et Arg3 sont classées en race 2 (Tableau 2.2).

**Tableau 2.1** : Désignation des 28 géotypes du pois.

Géotypes	Espèces correspondantes
JI 1412 (cv. Marlin), JI 1760 (cv. Consort-af), JI 1559 (cv. Mexique 4), JI 2480 (RIL 15x399_68), Radley, Polar, Messire, 74SN5, New Season, 1123, 2946, Merveille de Kelvedon	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>
P21, P614, P615	<i>P. sativum</i> ssp. <i>elatius</i>
P42, P627, P632, P633, P634, P638, Séfrou	<i>P. sativum</i> ssp. <i>arvense</i>
P650	<i>P. sativum</i> ssp. <i>jormadi</i>
P665	<i>P. sativum</i> ssp. <i>syriacum</i>
P656, P316, P669, P651	<i>P. fulvum</i>

**Tableau 2.2** : Origine et provenance des souches de Fop.

Souche de Fop	Race	Origine et provenance
R1	Race 1	Souches de référence "Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Pullman, USA"
R2F42	Race 2	
Arg1 et Arg3	Race 2	Isolées à partir des plantes symptomatiques et identifiées par PCR (facteur EF-1 $\alpha$ , ITS) IAS-CSIC, Cordoue, Espagne)

La régénération des souches fongiques est réalisée par des ensemencements sur le milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*), à 28 °C pendant quatre à cinq jours.

#### 2.1.1.2. Deuxième collection

La nouvelle collection est représentée par 60 autres génotypes de *Pisum* spp. dont 57 génotypes sont de l'espèce *P. sativum*, 2 génotypes de l'espèce *P. abyssinicum* et un seul génotype de l'espèce *P. fulvum*. Ces génotypes, de différentes origines, font partie de la collection de l'IAS-CSIC (Appendice D).

Le comportement de ces 60 génotypes a été étudié en interaction avec deux souches de Fop, R1 (race 1) et R2F42 (race 2) (Tableau 2.2).

#### 2.1.2. Prégermination des graines

Les graines de pois ont été superficiellement désinfectées pendant 20 min dans une solution d'hypochlorite de sodium (20%) puis rincées deux fois avec de l'eau distillée stérile. Les graines de chaque génotype sont enveloppées dans du papier filtre stérilisé, humectées et placées dans des boîtes de Pétri. Pour stratifier les graines, les boîtes ont été couvertes avec du papier aluminium et mises à 4 °C pendant 4 jours. Après stratification, les boîtes sont incubées à 25 °C jusqu'à la germination des graines. Les graines germées sont transférées dans des pots de 250 ml de volume, contenant de la perlite stérile et maintenues sous serre en polycarbonate (20 à 25 °C). Les plantules sont arrosées avec de l'eau courante selon le besoin de l'état hydrique.

#### 2.1.3. Inoculum fongique

Selon la technique décrite par DI PIETRO et RONCERO [229], les suspensions fongiques sont préparées en prélevant des disques mycéliens à partir de cultures de Fop, sur milieu PDA, âgées de 4 à 5 jours. 5 à 6 disques, d'un diamètre de 50 mm, sont mis dans des flacons de 200 ml contenant du milieu liquide PDB (*Potato Dextrose Broth*). L'incubation s'est déroulée à la température ambiante (20 à 25 °C), sous agitation continue (170 rpm). Après 5 jours, les spores sont récupérées par filtration de la suspension, à travers les mailles de 2 compresses stériles. A l'aide d'une cellule de Malassez, la concentration des filtrats a été mesurée et ajustée à  $5 \times 10^6$  spores/ml [230].

#### 2.1.4. Inoculation des plantules

L'inoculation des plantules a été conduite selon la technique d'immersion racinaire décrite par HAGLUND [230]. Au stade 2 à 3 nœuds, les plantes sont dépotées et les racines délicatement lavées sous l'eau du robinet pour enlever la perlite adhérente. Un tiers du système racinaire a été coupé avant l'immersion du reste de la racine dans la suspension de spores, pendant 5 min. Après l'inoculation, les plantes de pois sont transplantées dans leurs pots et incubées sous serre jusqu'à la fin de l'expérimentation ( $T^{\circ}$  :  $26 \pm 2$  °C, H% : 60-70%, photopériode : 10h jour/14h nuit).

#### 2.1.5. Traitements étudiés

##### 2.1.5.1. Première collection (28 génotypes)

L'expérimentation a pour objectif d'étudier l'interaction de deux facteurs :

- Facteur « génotype » composé de 28 niveaux correspondant aux 28 génotypes de pois étudiés (Tableau 2.1).
- Facteur « souche » comprend 5 niveaux correspondant aux quatre souches de Fop et au témoin sain traité, selon le même protocole, où la suspension de Fop est remplacée par de l'eau distillée stérile (EDS) lors de l'inoculation.

L'interaction des deux facteurs (28 x 5) est représentée par 140 traitements (Tableau 2.3). Comme chaque traitement est répété six fois (140 x 6), au total 840 plants sont randomisés dans 2 blocs aléatoires complets A et B, à raison de 3 répétitions par bloc (Figure 2.1).

##### 2.1.5.1. Deuxième collection (60 génotypes)

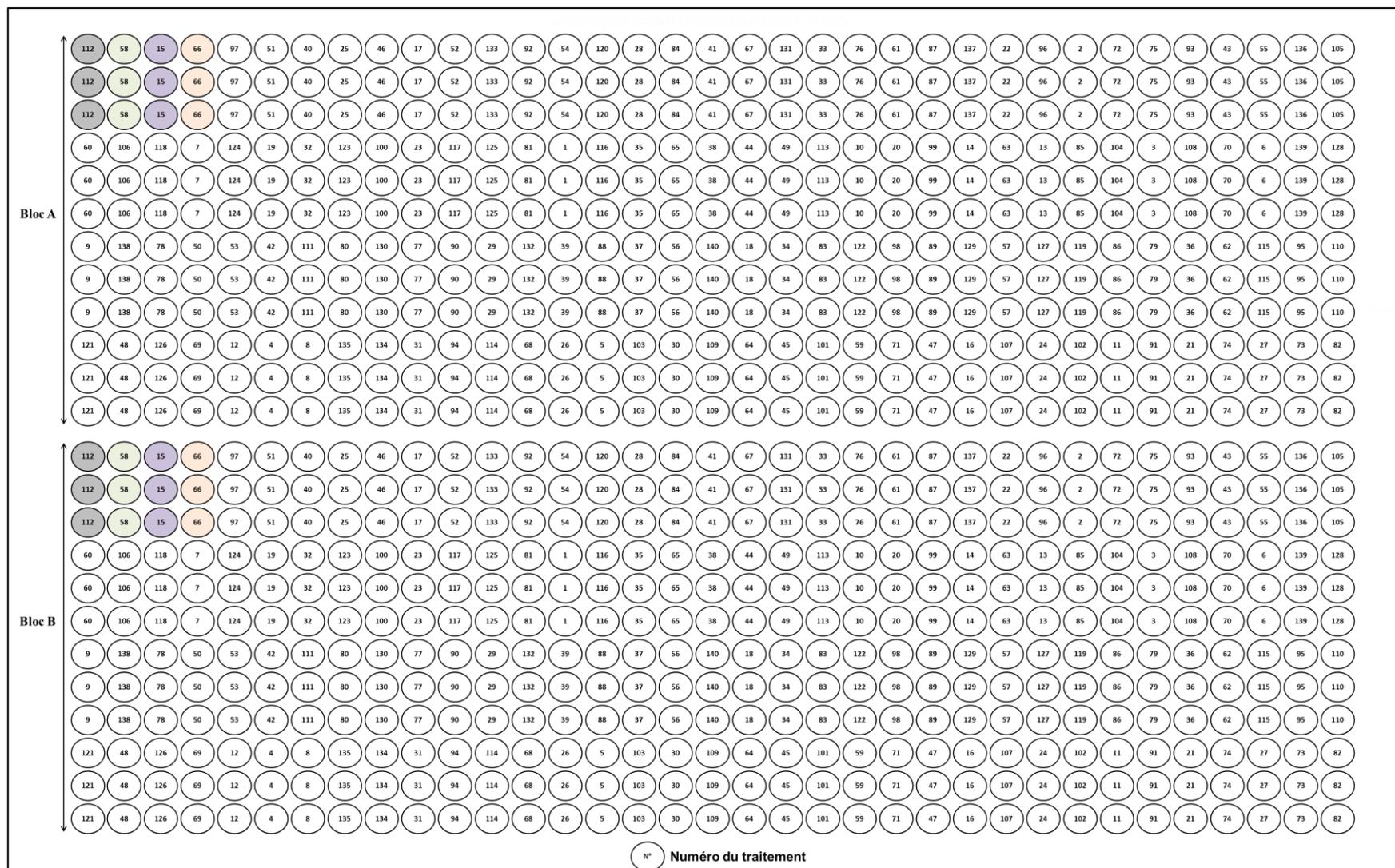
Dans ce deuxième essai, nous avons étudié l'interaction de deux facteurs :

- Facteur « génotype » avec 60 niveaux, représentés par les 60 génotypes du pois.
- Facteur « souche » avec 3 niveaux, représentés par les deux souches de Fop (R1 et R2F42), en plus de témoin sain (EDS).

Dans cet essai, 180 traitements sont étudiés (60 x 3) (Tableau 2.4), avec cinq répétitions pour chaque traitement (180 x 5), soit un total de 900 plants. Ces derniers sont répartis et randomisés selon un dispositif expérimental en deux blocs aléatoires complets A et B, à raison de 3 répétitions dans le bloc A et 2 répétitions dans le bloc B (Figure 2.2).

**Tableau 2.3** : Traitements étudiés de l'interaction des 28 génotypes de pois avec les quatre souches de Fop.

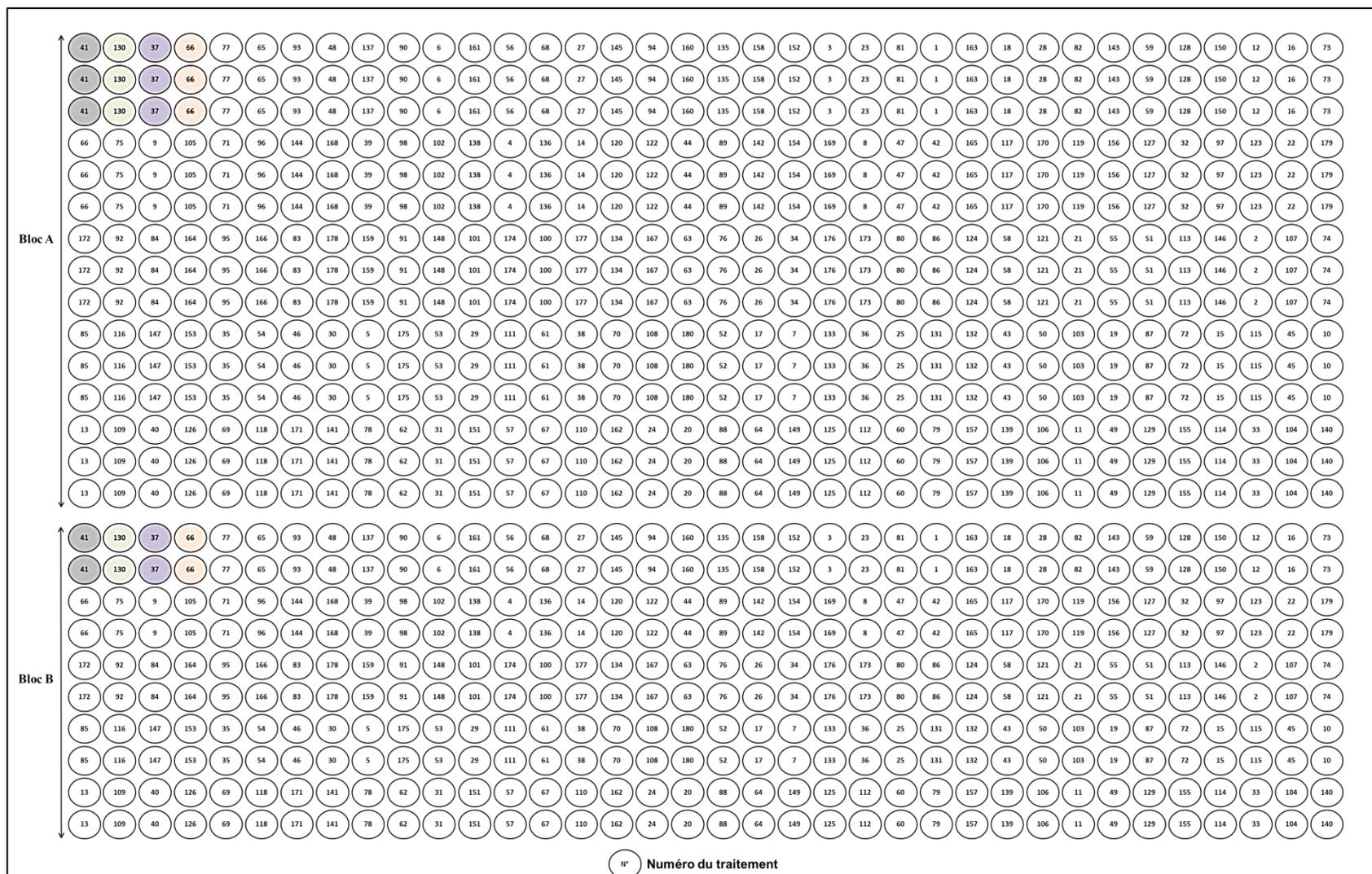
Génotypes	Souches de Fop				Témoins
	R1	R2F42	Arg1	Arg3	EDS
JI 1412	1	29	57	85	113
JI 1760	2	30	58	86	114
JI 1559	3	31	59	87	115
JI 2480	4	32	60	88	116
Radley	5	33	61	89	117
Polar	6	34	62	90	118
Messire	7	35	63	91	119
74SN5	8	36	64	92	120
New Season	9	37	65	93	121
1123	10	38	66	94	122
2946	11	39	67	95	123
P21	12	40	68	96	124
P42	13	41	69	97	125
P316	14	42	70	98	126
P614	15	43	71	99	127
P615	16	44	72	100	128
P627	17	45	73	101	129
P632	18	46	74	102	130
P633	19	47	75	103	131
P634	20	48	76	104	132
P638	21	49	77	105	133
P650	22	50	78	106	134
P651	23	51	79	107	135
P656	24	52	80	108	136
P665	25	53	81	109	137
P669	26	54	82	110	138
Séfrou	27	55	83	111	139
M. Kelvedon	28	56	84	112	140



**Figure 2.1 :** Dispositif expérimental adopté pour la collection de 28 génotypes de pois en interaction avec les 4 souches de Fop. (cf. Tableau 2.3, p. ex. 112: M. Kelvedon x Arg3).

**Tableau 2.4** : Traitements étudiés de l'interaction des 60 géotypes de pois avec les deux souches de Fop.

Géotypes	Souches de Fop		Témoin	Géotypes	Souches de Fop		Témoin
	R1	R2F42	EDS		R1	R2F42	EDS
1148	1	61	121	27	31	91	151
1149	2	62	122	223	32	92	152
1160	3	63	123	742	33	93	153
1171	4	64	124	801	34	94	154
1176	5	65	125	904	35	95	155
1196	6	66	126	1046	36	96	156
2905	7	67	127	1556	37	97	157
2938	8	68	128	2017	38	98	158
2946	9	69	129	2605	39	99	159
944	10	70	130	2714	40	100	160
952	11	71	131	3106	41	101	161
1994	12	72	132	760	42	102	162
1996	13	73	133	2310	43	103	163
1066	14	74	134	P65	44	104	164
2448	15	75	135	P39	45	105	165
2329	16	76	136	P315	46	106	166
2575	17	77	137	P629	47	107	167
2633a	18	78	138	P630	48	108	168
2633b	19	79	139	P633	49	109	169
3044	20	80	140	P648	50	110	170
3068	21	81	141	P26	51	111	171
3029	22	82	142	P69	52	112	172
3030	23	83	143	P691	53	113	173
3034	24	84	144	P692	54	114	174
2372	25	85	145	2367	55	115	175
2995	26	86	146	2370	56	116	176
2996	27	87	147	2378	57	117	177
2998	28	88	148	2076	58	118	178
22	29	89	149	2342	59	119	179
26	30	90	150	1943	60	120	180



**Figure 2.2 :** Dispositif expérimental adopté pour la collection de 60 génotypes de pois en interaction avec les 2 souches de Fop. (cf. Tableau 2.4, p. ex. 41: 3106 x R1).

### 2.1.6. Paramètres d'évaluation

La symptomatologie typique de la fusariose vasculaire du pois, le taux d'infection, l'indice de sévérité et le calcul des aires de progression de la maladie, sont les 4 paramètres utilisés pour évaluer le comportement de la première collection de 28 génotypes de pois. Pour la deuxième collection de 60 nouveaux génotypes, l'indice de sévérité n'est pas pris en considération, dont nous nous sommes contentés des 3 autres paramètres.

#### 2.1.6.1. Suivi symptomatologique

Les observations symptomatologiques concernent le suivi et le contrôle du développement des symptômes typiques de la fusariose vasculaire du pois sur les parties aériennes (symptômes externes) et au niveau du système vasculaire (symptômes internes) :

- Les symptômes externes s'expriment par un flétrissement et un jaunissement des feuilles suivis par un dessèchement et/ou la mort de la plante [113].
- Une décoloration rougeâtre des tissus de la tige et du collet de la plante a été précédemment décrite pour être associée aux infections par *F. oxysporum* [11]. L'examen de ces symptômes internes est réalisé avec des coupes pratiquées sur des plantes inoculées. Les plantes sont dépotées, 31 jours après l'inoculation puis lavées sous l'eau du robinet. A l'aide d'un scalpel, des coupes longitudinales sont réalisées sur la partie supérieure de la tige et sur le système racinaire, pour observation sous loupe binoculaire ou sous microscope optique.

#### 2.1.6.2. Taux d'infection

Le taux d'infection (TI%) est exprimé sur chaque plant individuellement. Il s'agit de calculer la proportion des feuilles symptomatiques par rapport au nombre total de feuilles de chaque plant, comme suit :

$$\text{Taux d'infection (\%)} = \frac{\text{Nombre de feuilles symptomatiques}}{\text{Nombre total des feuilles de la plante}} \times 100$$

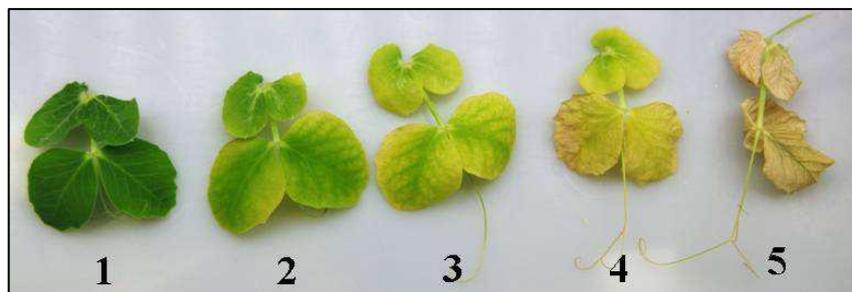
Le calcul des valeurs effectives des taux d'infection pour chaque plant a été réalisé comparativement aux témoins sains traités par l'eau distillée stérile. La catégorisation des réactions des plants aux inoculations est regroupée selon les classes adoptées par MCPHEE *et al.* [231] :

- $TI\% \leq 50\%$  : les géotypes sont résistants,
- $50\% < TI\% \leq 70\%$  : les géotypes sont partiellement résistants,
- $TI\% > 70\%$  : les géotypes sont sensibles.

#### 2.1.6.3. Indice de sévérité de la maladie (VIS)

Le calcul de l'indice visuel de la sévérité (VIS : *Visual Index of Severity*) se base sur l'évaluation des symptômes foliaires, de chaque plante, à l'aide d'une échelle visuelle de 5 niveaux (Figure 2.3) [20]. L'indice final est représenté par la moyenne des valeurs VIS de l'ensemble des feuilles de chaque plant.

$$\text{VIS} = \frac{\text{Somme de toutes les valeurs VIS des feuilles de la même plante}}{\text{Nombre total des feuilles}}$$



**Figure 2.3 :** Echelle de l'évaluation des symptômes de la fusariose vasculaire [20].

- (1) Feuille verte saine ; (2) initiation d'un jaunissement et d'un flétrissement ou d'un enroulement de la feuille ; (3) jaunissement ou flétrissement de plus de 50% de la feuille ; (4) jaunissement ou flétrissement complet de la feuille ; (5) feuille morte.

Le calcul des valeurs effectives des VIS pour chaque plante a été exécuté comparativement aux témoins traités par l'eau distillée stérile. La différenciation des réactions des plants aux inoculations est effectuée selon les classes désignées par NEUMANN et XUE [232] :

- $VIS \leq 3$  : les géotypes sont résistants,
- $3 < VIS \leq 4$  : les géotypes sont partiellement résistants,
- $VIS > 4$  : les géotypes sont sensibles.

#### 2.1.6.4. Courbe des aires de progression de la maladie (AUDPC)

Pour comparer les réactions des génotypes étudiés, vis-à-vis de la fusariose vasculaire, les valeurs des taux d'infection ont été utilisées pour calculer l'aire de progression de la maladie (AUDPC : *Area Under the Disease Progress Curve*), qui intègre l'intensité des symptômes et leur progression dans le temps, selon l'équation suivante [233]:

$$\text{AUDPC} = \sum \left[ \frac{x_i + x_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i) \right]$$

Dont :  $x_i$ : taux d'infection estimé à la date  $i$ ,  $x_{i+1}$ : taux d'infection estimé à la date  $i+1$ ,  $t_{i+1}$ : nombre de jours entre la date  $i$  et la date  $i+1$ .

Le calcul des valeurs effectives des AUDPC pour chaque plante, a été réalisé comparativement aux témoins traités par l'eau distillée stérile (témoins sains).

#### 2.1.7. Analyses statistiques

Les résultats des taux d'infection, des valeurs VIS et des valeurs AUDPC ont subi une analyse de variance (ANOVA) en utilisant le logiciel statistique « Systat » vers. 12.

Le calcul des moyennes des taux d'infection, des VIS et des valeurs AUDPC a été effectué, dont les différences sont significatives en se basant sur la plus petite différence au seuil  $\alpha \leq 5\%$ . De plus, une étude de corrélation entre le VIS et le taux d'infection a été effectuée.

## 2.2. Quantification moléculaire de Fop *in planta*

### 2.2.1. Matériel biologique

Pour quantifier l'ADN de Fop présent dans les tissus du pois, 7 génotypes de *Pisum* spp. ont été étudiés : P21, P648, 952, 2370, 2633a, 3029 et 3068 (Tableau 2.1 et Appendice D). La souche R2F42 de Fop a été utilisée, en qualité d'agent pathogène, lors des inoculations des plantules.

### 2.2.2. Inoculation et mise en culture

Des plantes au stade de deux à trois nœuds ont été inoculées par la suspension fongique de la souche R2F42 ( $5 \times 10^6$  spores/ml) suivant la technique d'immersion des racines partiellement coupées décrite auparavant [230]. Deux traitements ont été effectués en 3 répétitions:

- Le premier représente les témoins traités avec de l'eau distillée stérile.
- Le deuxième correspond aux plantes inoculées avec la souche R2F42 de Fop.

Les plantes sont incubées dans des conditions semi-contrôlées sous serre ( $T^\circ$  :  $26 \pm 2$  °C, H% : 60-70%). Quinze jours après l'inoculation, le collet de chaque plante a été récupéré et conservé en congélation (-80 °C).

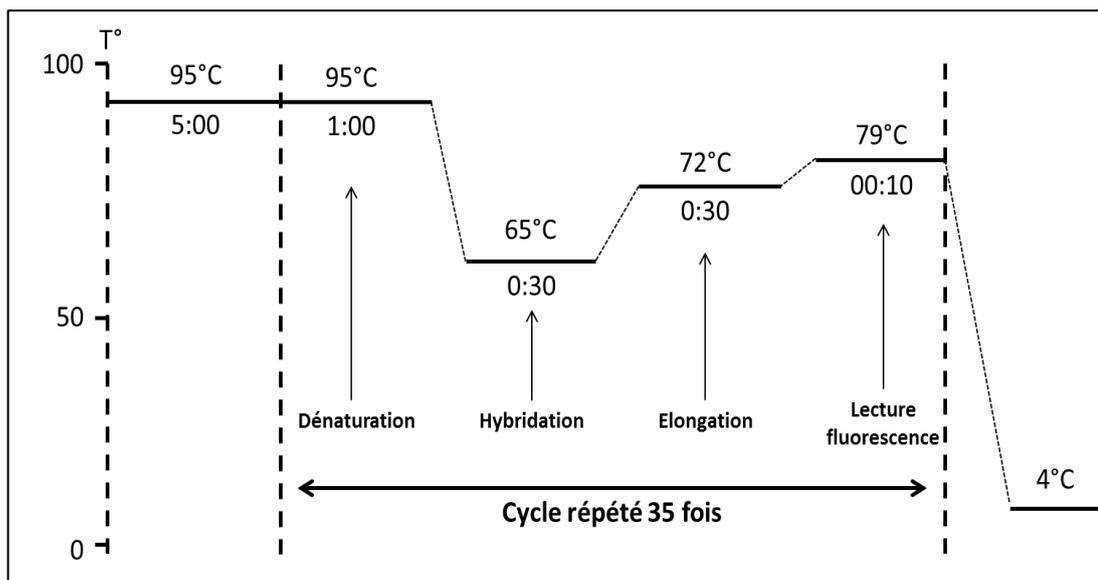
### 2.2.3. Extraction de l'ADN

Pour l'extraction de l'ADN total, nous avons suivi la méthode décrite par HARTNEY *et al.*, [234]. Les collets préalablement congelés ont été broyés, à l'aide d'un mortier, dans l'azote liquide. Les échantillons d'ADN de chaque traitement sont obtenus à partir de 100 à 200 mg du broyat homogénéisé dans 1 ml de tampon de lyse CTAB (appendice B). Pour isoler les acides nucléiques, l'homogénat a été incubé 30 min à température ambiante, en présence d'une solution contenant 4  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol et 1 ml de chloroforme/octanol (24:1, V/V). Après centrifugation (7000 rpm, 5 min) à la température ambiante, le surnageant de chaque échantillon, contenant les acides nucléiques, est incubé 1h à -80 °C en présence de 1 ml d'éthanol (100%) préalablement refroidi à -20 °C pour précipiter l'ADN. Après incubation et centrifugation (3000 rpm, 5min) à la température ambiante, le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est lavé avec 1ml d'éthanol froid (75%). Le culot d'ADN est ensuite séché, toujours à température ambiante, et re-suspendu avec 50  $\mu$ l d'eau ultra pure. Pour éliminer toute trace d'ARN, les échantillons sont ensuite traités avec 4  $\mu$ l d'ARNase A pendant 1h à 37 °C.

Afin de contrôler la pureté de l'ADN, 1  $\mu$ l de chaque échantillon a été séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose (0,7%) et en présence du tampon TAE (Appendice B). En parallèle, la concentration en ADN est déterminée par spectrophotométrie à 280 nm par un NanoDrop 1 000 (Thermo SCIENTIFIC, Etats-Unis).

#### 2.2.4. Quantification par PCR en temps réel

L'essai de quantification de Fop par RT-PCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*) a été conduit dans des plaques à 48 puits avec l'appareil et le logiciel du système de détection des séquences StepOne (Applied Biosystems, Etats-Unis). Pour réaliser la réaction, nous avons suivi les instructions du fabricant. Les conditions thermiques sont 5 min à 95 °C, suivies de 35 cycles de 1 min à 95 °C et 30 s à 65 °C, en plus de 10 s à 79 °C pour la lecture de la fluorescence (Figure 2.4).



**Figure 2.4 :** Conditions thermiques de la RT-PCR.

Les échantillons et le témoin négatif (eau moléculaire pure) ont été répétés 3 fois. Un ensemble d'une série de dilutions de la culture pure de la souche R2F42 de Fop (10 ng/μl, 1 ng/μl, 0.1 ng/μl, 0.01 ng/μl et 0.001 ng/μl), a été incorporé dans chaque test RT-PCR et répété 3 fois pour générer une courbe standard. L'ADN standard correspond à l'ADN génomique de la souche R2F42 est extrait à partir du mycélium et préalablement ajusté à 10 ng/μl avant de faire les dilutions successives de 10.

La réaction a été réalisée dans un volume total de 20 μl contenant les éléments présentés dans le Tableau 2.5. Nous avons utilisé le kit Roche Bioscience (FastStart Universal SYBR Green Master Rox), contenant la Taq polymérase, le tampon, le chromophore et les dNTPs. Les séquences génomiques de Fop ont été amplifiées en utilisant les amorces FOR1 et FOR2 à une concentration de 2μM :

- Amorce 1 (sens): FOR1 (5'-ACATACCACTTGTTGCCTCG-3').
- Amorce 2 (anti-sens): FOR2 (5'-CGCCAATCAATTTGAGGAACG-3').

**Tableau 2.5** : Composition du mélange pour la RT-PCR pour un tube.

<b>Composant</b>	<b>Quantité</b>
Fast Start SYBR green Master Mix (2x)	10 µl
Amorce 1: FOR 1	0.4 µl
Amorce 2: FOR 2	0.4 µl
ADN total	4 µl
Eau moléculaire	5.2 µl

## 2.3. Dosage de la pisatine

### 2.3.1. Matériel biologique

La quantification de la pisatine, accumulée dans les racines des plants de pois, a été testée avec 4 génotypes (952, 3029, 3068 et 2996) (Appendice D), inoculés avec la souche R2F42 de Fop (Tableau 2.2).

### 2.3.2. Inoculation et mise en culture

Des plantes au stade de deux à trois nœuds issues de graines préalablement désinfectées, ont été inoculées par la suspension fongique de la souche R2F42 de Fop ( $5 \times 10^6$  spores/ml) suivant la technique d'immersion des racines partiellement coupées décrites auparavant [230].

Chaque génotype est représenté par quatre traitements en trois répétitions, selon le temps considéré après inoculation :

- Le premier : témoins récupérés juste après l'inoculation.
- Le deuxième : plantes récupérées 24h après l'inoculation.
- Le troisième : plantes récupérées 48h après l'inoculation.
- Le quatrième : plantes récupérées 15 jours après l'inoculation.

### 2.3.3. Extraction de la phase organique

Pour extraire la phase organique susceptible de contenir la pisatine, nous avons suivi la technique décrite par BANI *et al.* [235]. Les racines des plantes ont été manuellement broyées dans un mortier contenant de l'azote liquide. 200 mg de la poudre végétale obtenue, sont utilisés pour l'extraction, dans des tubes contenant 20

ml de la solution d'extraction (50% méthanol-0,5% NaCl). La suspension obtenue a été ensuite centrifugée (20 min, 7000 rpm à 10 °C). Le surnageant a été récupéré et re-centrifugé de nouveau deux fois dans les mêmes conditions précédentes.

L'extraction est réalisée avec l'acétate d'éthyle à l'aide d'une ampoule à décanter. Le solvant a été ajouté en double volume de la solution à extraire. La phase organique a été récupérée et l'opération d'extraction a été répétée 3 fois. Une fois la phase organique finale est récupérée, nous avons ajouté 5 g de sulfate de sodium afin d'éliminer toutes traces d'eau. La solution est ainsi filtrée, pour éliminer le précipitât du sulfate de sodium et mise dans des flacons en verre. Pour concentrer la solution, le contenu des flacons est séché à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le produit séché obtenu est utilisé pour la séparation de ses composants chimiques par chromatographie.

#### 2.3.4. Séparation des composants par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La teneur en pisatine des extraits organiques a été effectuée par HPLC suivant la méthode décrite par PREISIG *et al.* [236] et modifiée par BANI *et al.* [235], en utilisant l'appareil Agilent (série 1200, Etats-Unis), équipé d'un détecteur à barrette de photodiodes (309 nm). Les extraits organiques dissous dans le méthanol sont séparés sur une colonne Agilent Eclipse XDB-C18, avec une phase mobile composée d'acétonitrile et d'eau (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O, 25:75, v/v) transformée en CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (46:54, v/v) par un gradient linéaire chaque 50 min. Les conditions initiales ont été reconstituées selon un gradient linéaire après la 5<sup>ème</sup> minute, et la colonne a été rééquilibrée dans ces conditions pour 10 min avant le lancement du prochain cycle avec un débit de 1.0 ml/min. Le temps de rétention de la pisatine était de 23,5 ± 0.7 min dont la teneur en pisatine des extraits organiques a été mise en évidence par co-injection.

Pour quantifier la pisatine, une courbe d'étalonnage de l'HPLC est réalisée, avec la quantité absolue de pisatine précédemment isolée et dissoute dans le méthanol, dans un intervalle de 0.5-40 µg (0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30 et 40 µg), en répétant trois fois chaque concentration (Tableau 2.6). La courbe de progression linéaire de l'HPLC pour la pisatine, représentée par la quantité absolue rapportée à l'aire du pic chromatographique, a été obtenue en se basant sur des valeurs pesées et calculées à partir des 8 montants cités auparavant.

**Tableau 2.6** : Caractéristiques analytiques de la courbe d'étalonnage de la pisatine.

<b>T<sub>r</sub> (min)</b>	<b>Intervalle</b>	<b>Pente</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>N° de points de donnée</b>
23,5 ± 0.7	0,5-40	514,06	0,997	8

La courbe est calculée par la forme  $y = a + bx$  dont (y) : l'aire du pic chromatographique et (x) :  $\mu\text{g}$  du métabolite injecté. T<sub>r</sub> : Temps de rétention. r<sup>2</sup> : coefficient de détermination.

Les échantillons ont été dissous dans du méthanol à 10 mg d'extrait/ml et des aliquotes de 20  $\mu\text{L}$  ont été injectées dans l'appareil de l'HPLC. Chaque échantillon a été dosé 3 fois. La quantification de la pisatine a été calculée en interpolant l'aire des pics chromatographiques avec les données de la courbe d'étalonnage et exprimée en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait ou en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de racine.

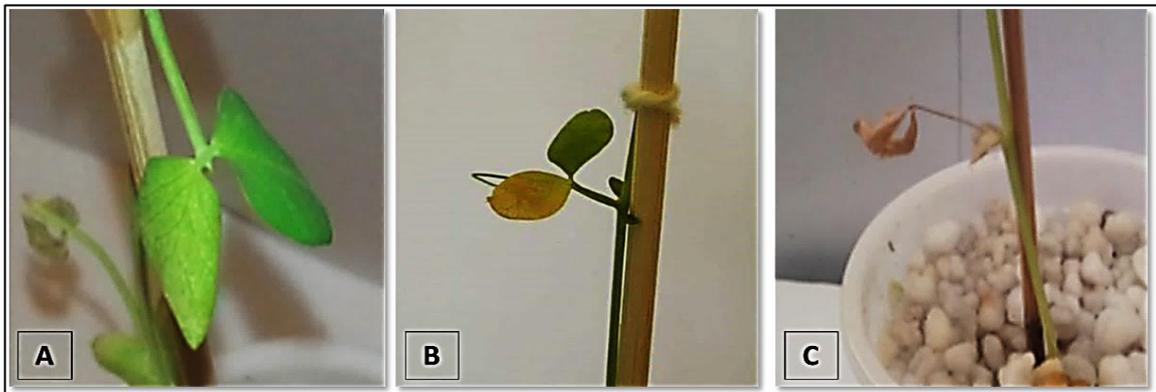
## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. Comportement des 28 génotypes de pois vis-à-vis des 4 souches de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisii*

##### 3.1.1. Description symptomatologique

L'expression de la fusariose vasculaire souvent apparaît sur les parties foliaires, qui expriment les conséquences des atteintes racinaires et vasculaires. Les symptômes commencent par l'enroulement des extrémités du limbe vers le bas (Figure 3.1A), accompagné d'un jaunissement unilatéral (Figure 3.1B) qui se poursuit le long des feuilles. A ce stade, dans le cas des génotypes sensibles, il y a développement de nécroses progressives, jusqu'à ce que la feuille entière flétrisse et se dessèche (Figure 3.1C).



**Figure 3.1** : Evolution des symptômes de la fusariose vasculaire sur les feuilles du pois.

(A) Enroulement, (B) jaunissement unilatéral et (C) dessèchement de la feuille.

Au niveau de la plante entière, les premiers symptômes sont perceptibles sur les génotypes sensibles 7 à 10 jours après l'inoculation, sur les premières feuilles (Figures 3.2B et 3.3B), et atteignent progressivement les jeunes feuilles jusqu'au dessèchement complet (Figure 3.3D) et la mort de la plante entière. Ce tableau symptomatologique a été clairement observé dans le cas du génotype Messire infecté par la souche R2F42 (Figure 3.3E).



**Figure 3.2 :** Progression des symptômes de la fusariose vasculaire chez le génotype Séfrou inoculé avec la souche R1.

(A) 7 jours, (B) 13 jours, (C) 19 jours et (D) 27 jours après l'inoculation.



**Figure 3.3** : Progression des symptômes de la fusariose vasculaire chez le génotype Messire inoculé avec la souche R2F42.

(A) 7 jours, (B) 13 jours, (C) 19 jours, (D) 27 jours et (E) 31 jours après l'inoculation.

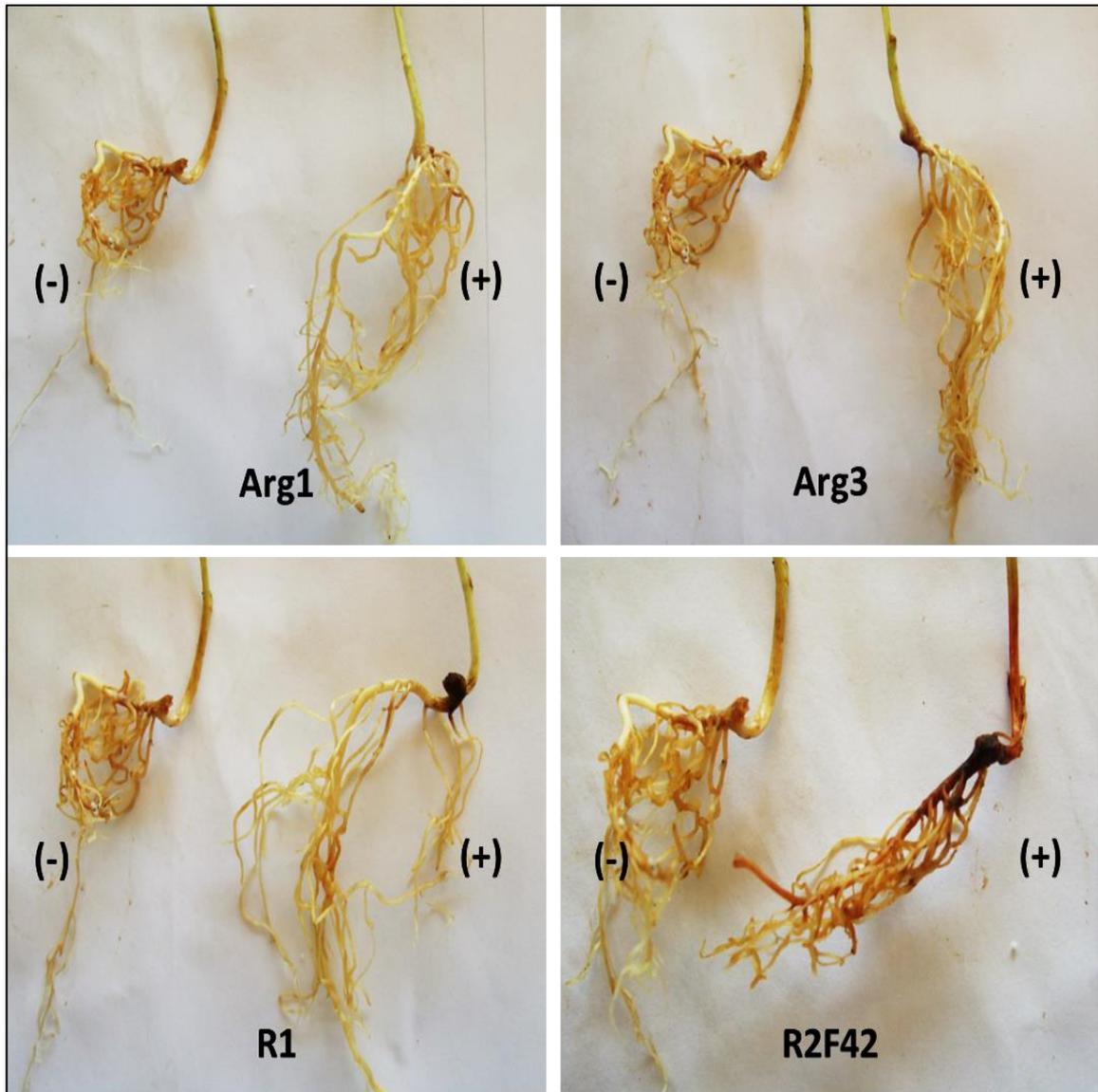
Nous avons constaté que les quatre souches de Fop provoquent les mêmes symptômes sur l'ensemble des génotypes (flétrissement, jaunissement et dessèchement), en notant que la souche R2F42 a induit des symptômes plus intenses que les souches R1, Arg1 et Arg3, sur les génotypes 2946, P21, P615, P634, 1123 et Messire (Figure 3.4).



**Figure 3.4 :** Comportement du génotype Messire, 31 jours après son inoculation avec les quatre souches de Fop.

(+) Plante inoculée, (-) témoin (EDS).

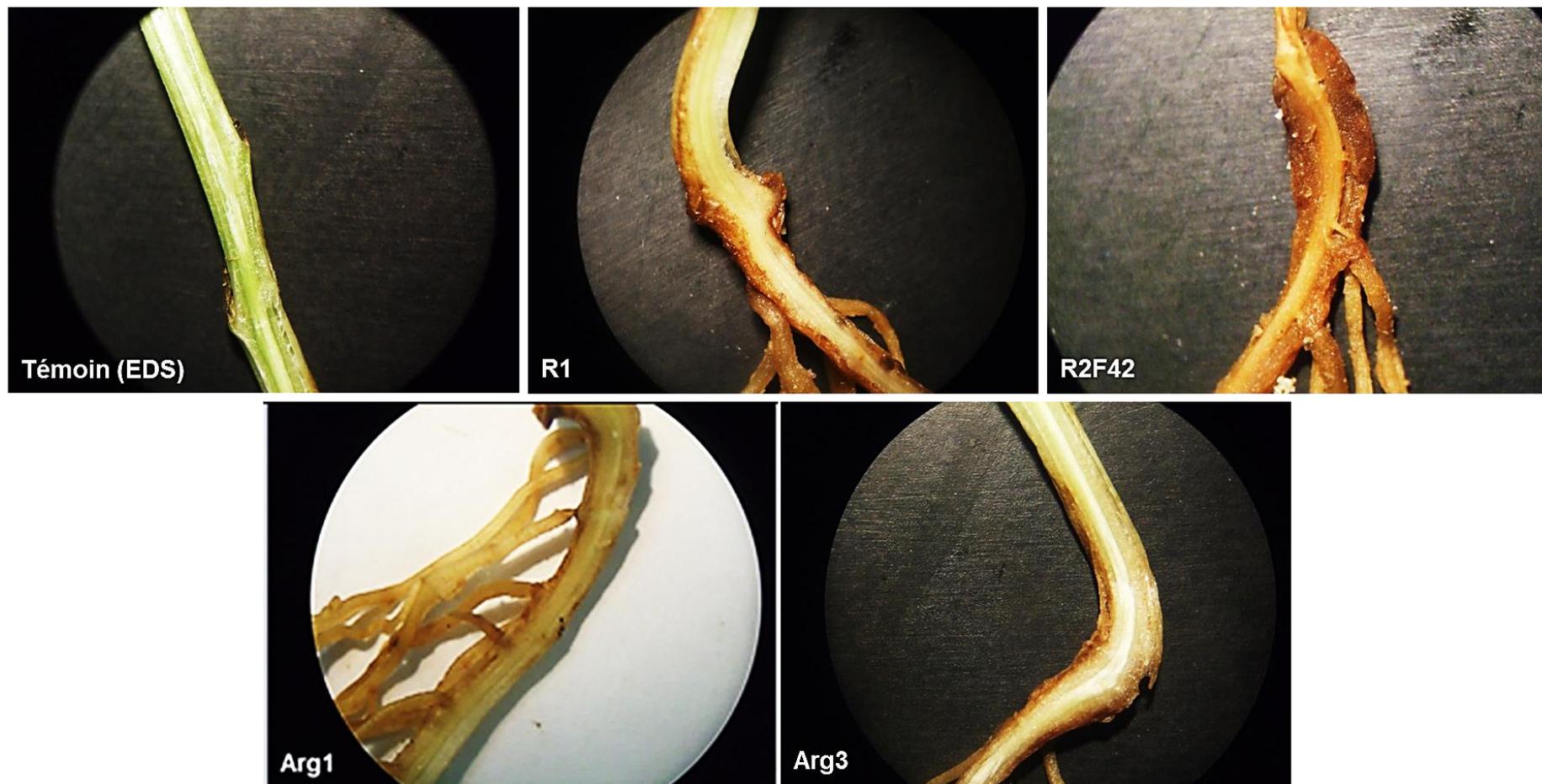
En parallèle avec les symptômes foliaires, la souche R2F42 (race 2) a causé une décoloration rouge foncé à brun sur les racines et le collet de la plupart des génotypes testés. Les souches R1, Arg1 et Arg3 de Fop quand à elles n'ont pas causé cette décoloration (Figure 3.5).



**Figure 3.5** : Aspect des racines du génotype P632, 31 jours après l'inoculation avec les quatre souches de Fop.

(+) Plante inoculée, (-) plante non inoculée (témoin).

Quant aux symptômes internes, l'observation des coupes sous loupe binoculaire (×8), a montré une décoloration brune des tissus parenchymateux des différents génotypes testés (Figure 3.6). De plus, une décoloration rouge foncé du système vasculaire est visible chez les plantes inoculées par la souche R2F42 (Figure 3.6).



**Figure 3.6** : Symptômes internes chez le génotype Messire, 31 jours après l'inoculation avec les quatre souches de Fop (G: x8).

### 3.1.2. Taux d'infection et VIS

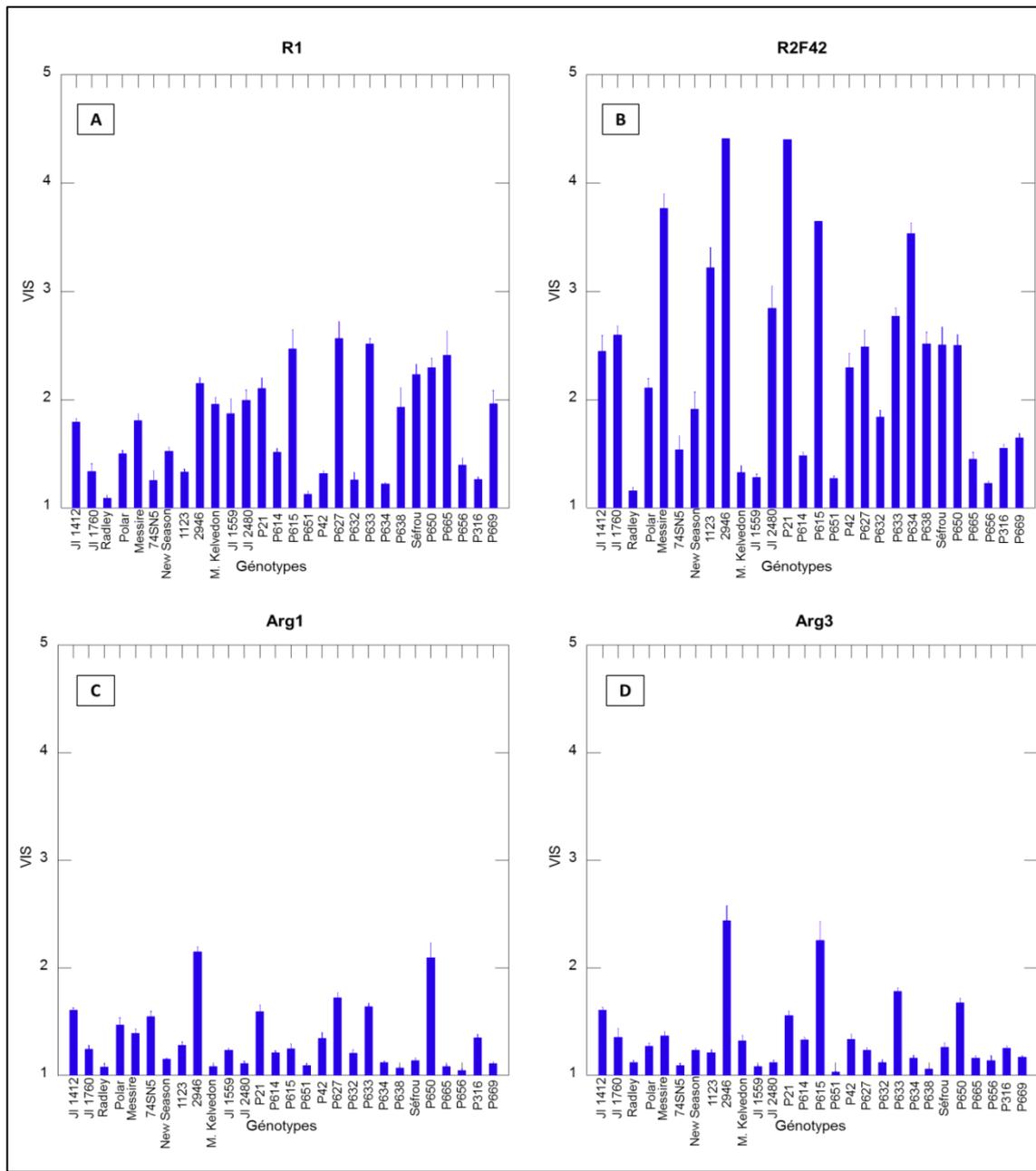
L'analyse de la variance (ANOVA) des taux d'infection et des valeurs VIS a mis en évidence des différences significatives de la virulence des quatre souches de Fop (Appendice E). La souche R2F42 a induit les taux d'infection et les valeurs VIS les plus élevés (Figure 3.7B), alors que les valeurs les plus faibles sont enregistrées chez les deux souches Arg1 et Arg3 (Figures 3.7C et D).

L'ANOVA a révélé des différences significatives entre les 28 génotypes étudiés (Appendice E). Les génotypes Messire, 2946, P21 et P634 inoculés avec la souche R2F42, ont montré des taux d'infection et des VIS plus importants, tandis que les génotypes JI 1760, 74SN5 et Radley inoculés avec les souches Arg1 et Arg3, ont montré les valeurs les plus faibles. Les taux d'infection enregistrés, 31 jours après l'inoculation, varient de 15,74% (JI 2480-Arg3) à 64,58% (2946-R2F42) (Appendice F). Les valeurs VIS varient de 1,03 (P651-Arg3: Figure 3.7D) à 4,41 (2946-R2F42 : Figure 3.7B).

En interaction avec la souche R1, tous les génotypes se sont avérés résistants, montrant des VIS inférieurs à 3. Le génotype P627 a la valeur effective de VIS la plus importante (2,56), suivi par P633 (2,52), P615 (2,47), P665 (2,41), P650 (2,29), Séfrou (2,23) et 2946 (2,15). Les deux génotypes Radley et P651 ont les VIS les plus faibles (1,09 et 1,13, respectivement) (Figure 3.7A).

En interaction avec la souche R2F42, les génotypes 2946 et P21 sont les plus sensibles en enregistrant des VIS supérieurs à 4. Les génotypes Messire, 1123, P615 et P634 sont partiellement résistants avec des VIS compris entre 3 et 4, alors que les génotypes les plus résistants sont Radley, P656, P651, JI 1559 et Merveille de Kelvedon en enregistrant des VIS inférieurs à 1,5 (Figure 3.7B).

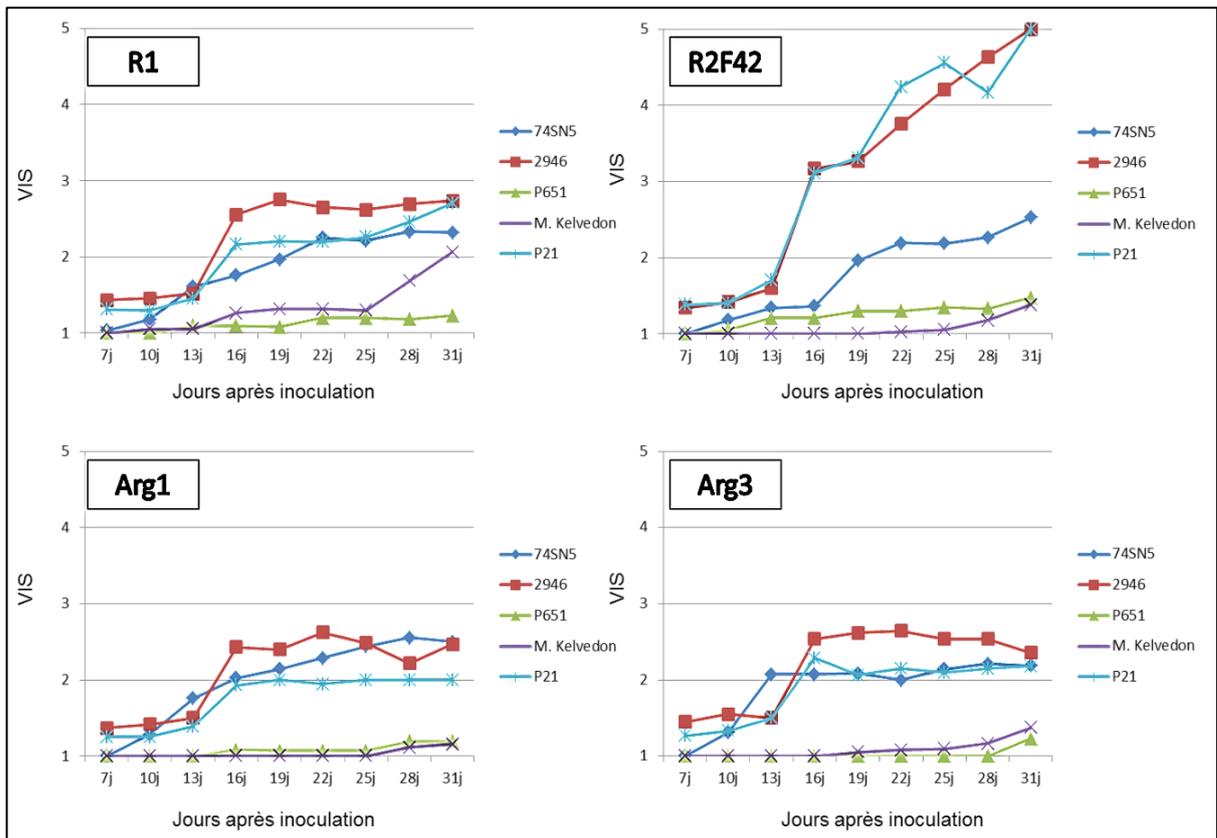
Tous les génotypes étudiés, inoculés avec la souche Arg1, sont résistants (VIS < 2,5), tel le cas du génotype 2946 (2,15) et le génotype P656 (1,05) (Figure 3.7C). En interaction avec la souche Arg3, les 28 génotypes sont résistants à cette souche (VIS < 2,5) (Figure 3.7D).



**Figure 3.7 :** Valeurs effectives de VIS des 28 géotypes de pois, 31 jours après leur inoculation avec les quatre souches de Fop.

Les barres d'erreur correspondent aux écarts types issus de 6 répétitions.

De même que la progression des taux d'infection (Appendice I), la cinétique des valeurs VIS durant la période du suivi témoigne d'une progression très rapide de la maladie chez les géotypes inoculés avec la souche R2F42, avec laquelle l'apparition des premiers symptômes a été notée à partir du 7<sup>ème</sup> au 10<sup>ème</sup> jour après l'inoculation, sur la plupart des géotypes étudiés (Figure 3.8). La seule exception est le cas du géotype Merveille de Kelvedon qui a montré une période de latence relativement longue, puisque les symptômes n'étaient pas visibles sur ce géotype qu'à partir du 22<sup>ème</sup> jour après l'inoculation (Figure 3.8).

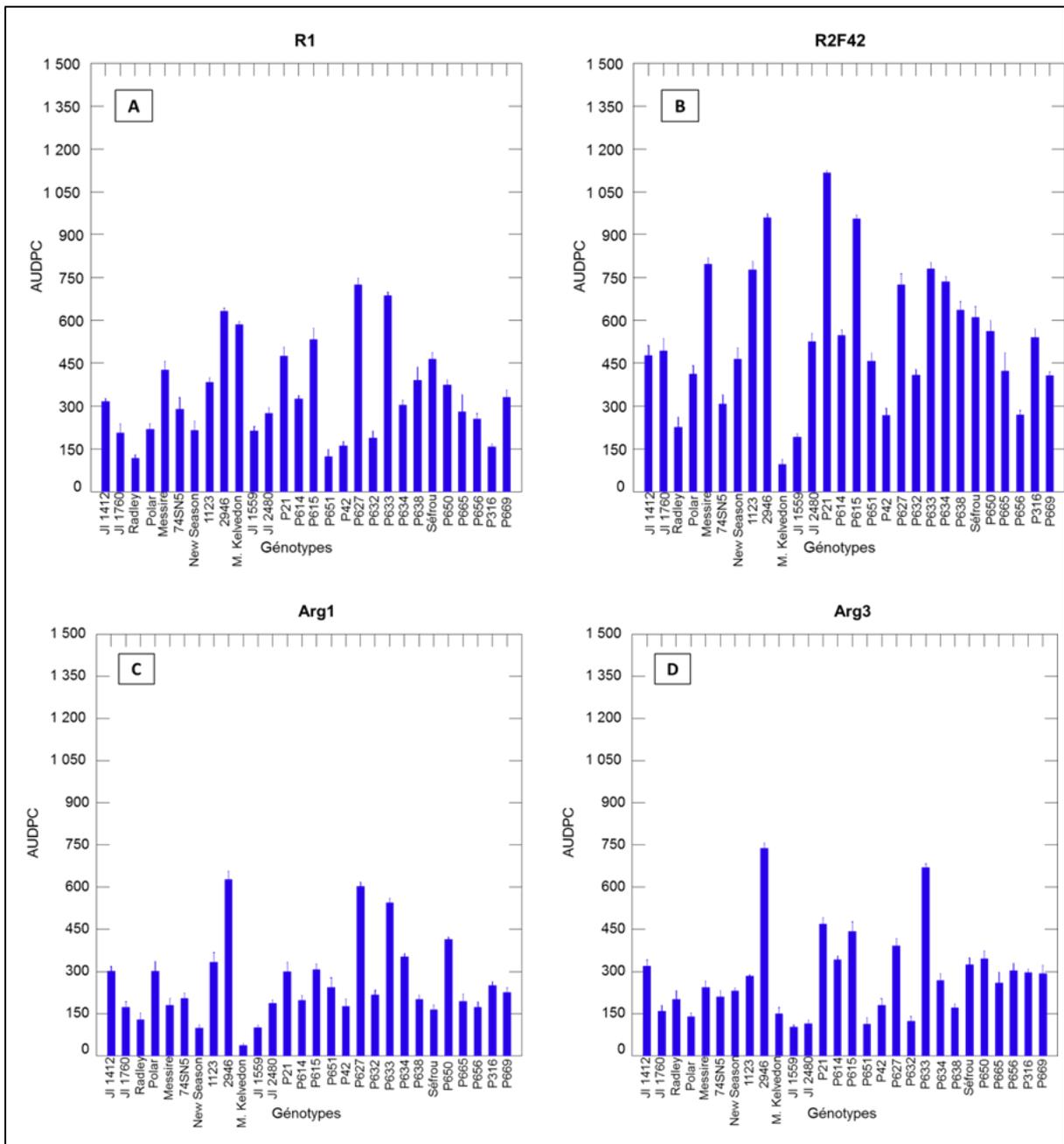


**Figure 3.8 :** Evolution des valeurs VIS des géotypes 74SN5, 2946, P651, Merveille de Kelvedon et P21 inoculés avec les quatre souches de Fop.

En interaction avec les souches R1, Arg1 et Arg3, les géotypes 2946 et P21 ont montré les premiers symptômes à partir du 7<sup>ème</sup> jour, pour atteindre des valeurs VIS avoisinant 3, 16 jours après leur inoculation (Figure 3.8). Les géotypes les plus résistants (Merveille de Kelvedon et P651) ont enregistré une cinétique très lente avec apparition des premiers symptômes 13 jours (R1), 16 jours (Arg1) et 19 jours (Arg3) après leur inoculation (Figure 3.8).

### 3.1.3. AUDPC

L'analyse de la variance des valeurs AUDPC a montré des différences significatives entre la virulence des quatre souches de Fop (Appendice E). Les valeurs AUDPC les plus importantes ont été enregistrées avec la souche R2F42 (Figure 3.9B), tandis que les valeurs les plus faibles ont été enregistrées avec les deux souches Arg1 et Arg3 (Figure 3.9C et D).



**Figure 3.9 :** Valeurs effectives d’AUDPC des 28 géotypes de pois inoculés avec les quatre souches de Fop.

Les barres d’erreur correspondent aux écarts types issus de 6 répétitions.

L’ANOVA a mis en évidence aussi des différences significatives entre les réactions des 28 géotypes inoculés (Appendice E). Les valeurs AUDPC les plus importantes sont enregistrées chez les géotypes P21, 2946 et P615 inoculés avec la souche R2F42 (Figure 3.9B), alors que les valeurs les plus faibles sont notées chez les géotypes JI1559 et Merveille de Kelvedon inoculés avec les souches Arg1 et Arg3 (Figure 3.9C et D). Les valeurs sont comprises entre 36,64 (Merveille de Kelvedon-Arg3: Figure 3.9D) et 1115,87 (P21-R2F42: Figure 3.9B).

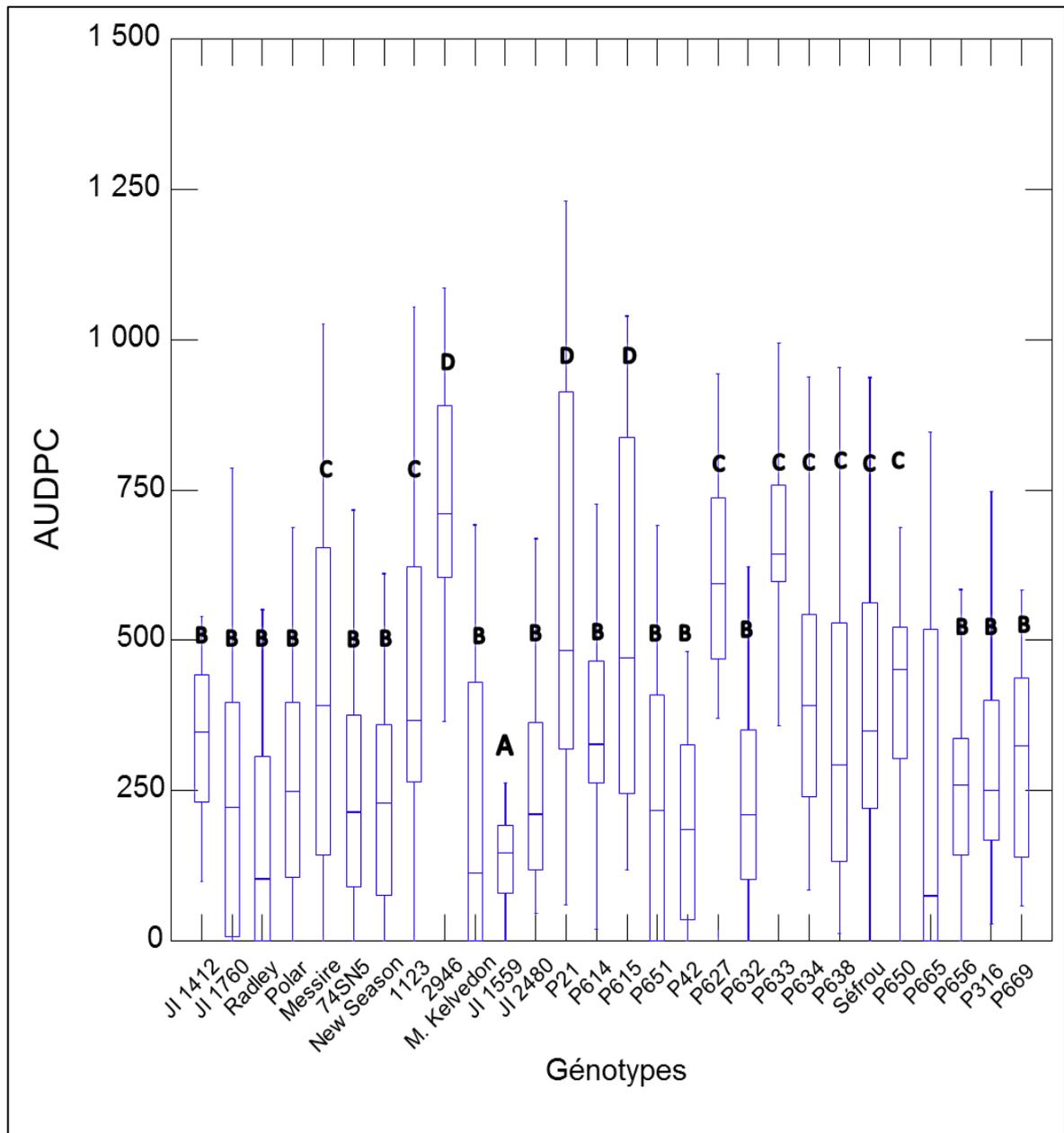
En interaction avec la souche R1, les AUDPC les plus importants ont été enregistrés chez les génotypes P627, P633 et 2946 ( $> 600$ ), tandis que les plus faibles ( $< 150$ ) sont enregistrés chez les génotypes Radley et P651 (Figure 3.9A). En interaction avec la souche R2F42, les génotypes P21, 2946 et P615 ont enregistré des AUDPC dépassant 900, alors que les génotypes Merveille de Kelvedon, JI 1559 et Radley sont les plus résistants (AUDPC  $< 300$ ) (Figure 3.9B).

En interaction avec la souche Arg1, les génotypes 2946, P627 et P633 ont noté les valeurs les plus élevées (AUDPC  $> 400$ ). Les trois génotypes Merveille de Kelvedon, New Season et JI1559 sont les plus résistants (AUDPC  $< 105$ ) (Figure 3.9C). Avec la souche Arg3, les génotypes 2946 et P633 ont enregistré des AUDPC supérieurs à 650. Le génotype JI1559 est le plus résistant à cette souche (101,42), suivi par les génotypes P651 (112,47), JI 2480 (115,04) et P632 (123,12) (Figure 3.9D).

Le calcul des valeurs minimales et maximales d'AUDPC, correspondant aux 28 génotypes, révèle la variabilité de leurs réponses vis-à-vis des quatre souches de Fop. De cette manière, 4 groupes sont distingués (Figure 3.10):

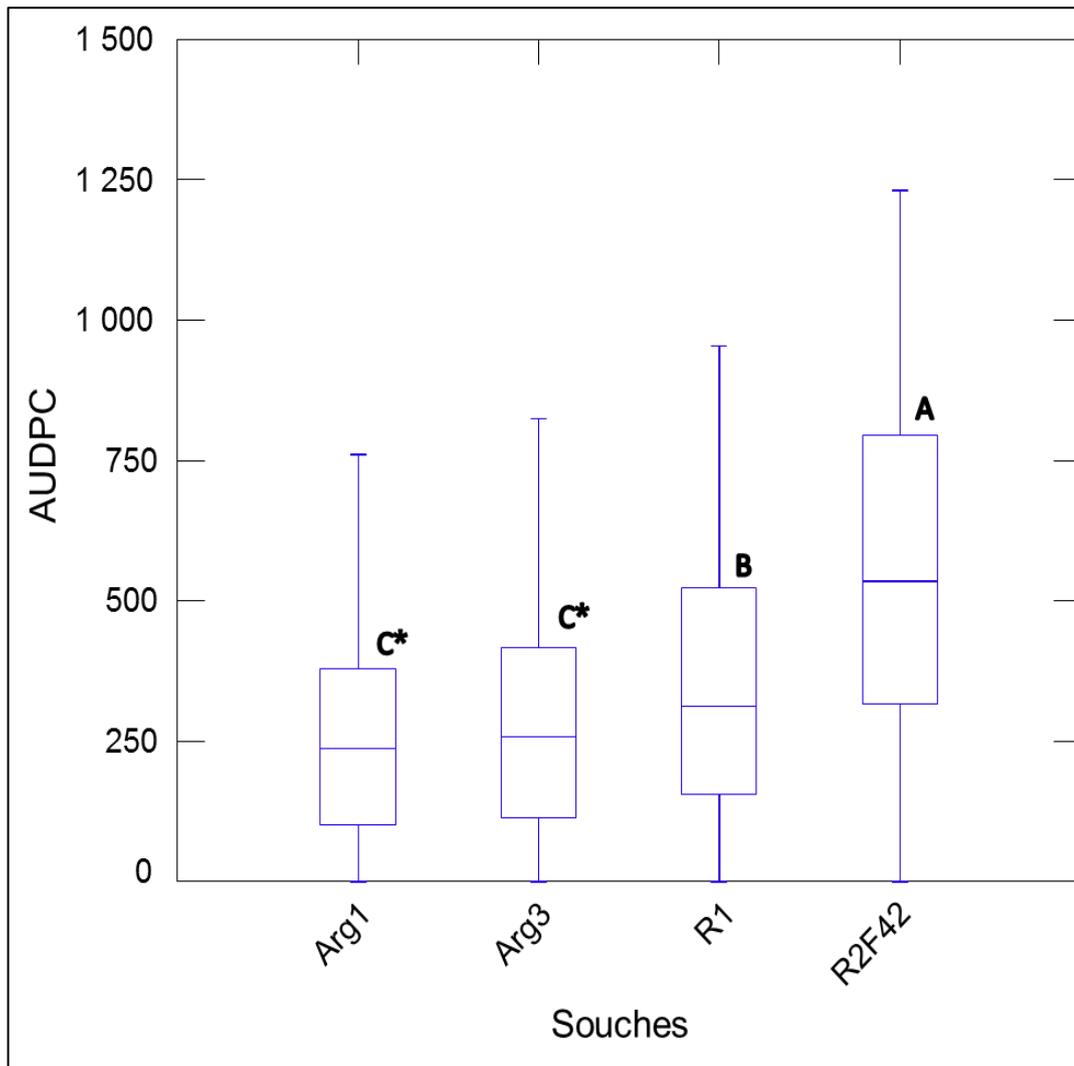
1. Le groupe A, (AUDPC  $< 250$ ) représente le génotype JI1559 en interaction avec les quatre souches du pathogène (Figure 3.10A).
2. Le groupe B, avec des valeurs relativement faibles ( $0 < \text{AUDPC} < 500$ ), composé de 15 génotypes : JI1412, JI1760, Radley, Polar, 74SN5, New Season, Merveille de Kelvedon, JI2480, P614, P651, P42, P632, P656, P316 et P699 (Figure 3.10B).
3. Le groupe C, dont les valeurs sont intermédiaires ( $100 < \text{AUDPC} < 750$ ), regroupe 8 génotypes : Messire, 1123, P627, P633, P634, P638, Séfrou et P650 (Figure 3.10C).
4. Le groupe D, le plus sensible ( $250 < \text{AUDPC} < 1000$ ) composé de trois génotypes : 2946, P21 et P615 (Figure 3.10D).

Le génotype P665 a enregistré les plus grandes variations fluctuant entre 0 et plus de 500 indiquant une différence très marquée de susceptibilité selon la souche de Fop testée (Figure 3.10).



**Figure 3.10** : Valeurs minimales et maximales d’AUDPC des 28 génotypes de pois.

En comparant les valeurs minimales et maximales des AUDPC, correspondant aux quatre souches de Fop, nous déduisons que les valeurs les plus importantes sont notées avec la souche R2F42 (Figure 3.11A). La race 1 représentée par la souche R1 est moins virulente que la souche R2F42 (Figure 3.11B), mais plus virulente que les souches Arg1 et Arg3. Ces deux dernières souches n’ont pas montré des différences significatives entre elles (Figure 3.11C).



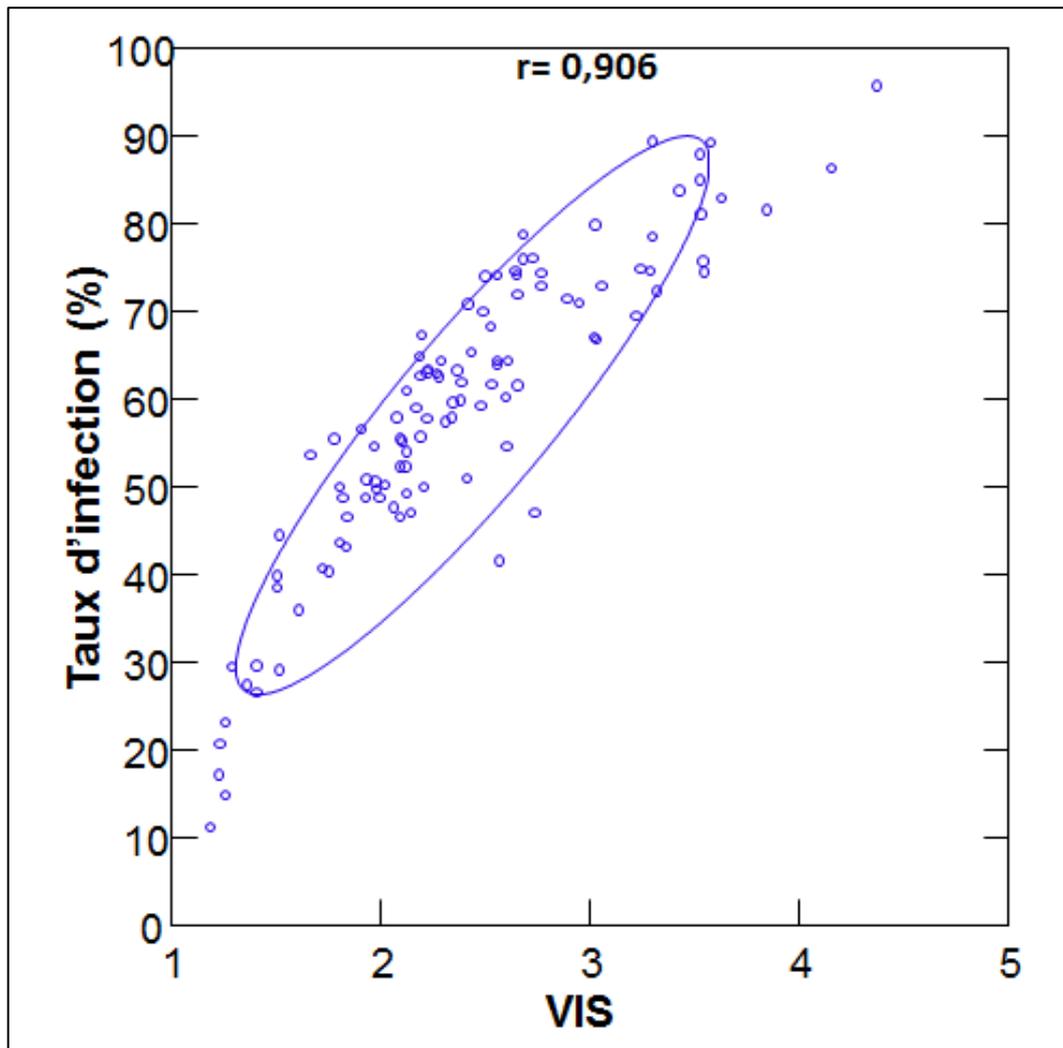
**Figure 3.11** : Valeurs minimales et maximales d'AUDPC des quatre souches de Fop.

(\*) : Les valeurs ayant la même lettre ne présentent pas des différences significatives.

#### 3.1.4. Corrélation entre taux d'infection et VIS

Le coefficient de corrélation entre la sévérité de la maladie et les taux d'infection des génotypes inoculés est très élevée ( $r=0,902$ ,  $p=0,000$ ) (Figure 3.12).

Les résultats obtenus à partir du calcul des deux paramètres (VIS et taux d'infection) sont fortement semblables, permettant de bien distinguer les génotypes résistants, les génotypes sensibles et même les réactions intermédiaires (génotypes partiellement résistants). La forte corrélation entre les deux paramètres indique la possibilité d'utiliser un de ces paramètres pour déterminer le comportement des génotypes face à la fusariose vasculaire.



**Figure 3.12** : Corrélation de la distribution des VIS et taux d'infection.

### 3.2. Comportement de la nouvelle collection de 60 géotypes de pois face aux 2 souches de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*

#### 3.2.1. Description symptomatologique

Sept à 10 jours après l'inoculation, les premiers symptômes typiques de la fusariose vasculaire du pois sont notables sur certains géotypes (Figure 3.13). Les symptômes commencent sur les feuilles primaires (Figure 14.A) et atteignent progressivement les jeunes feuilles jusqu'à ce que l'ensemble de la plante flétrit et meurt 19 à 30 jours après inoculation (Figure 3.14).



**Figure 3.13** : Comportement des géotypes, 10 jours après leur inoculation avec les souches R1 et R2F42 de Fop par rapport aux témoins (EDS).

(A) Génotype 944 et (B) génotype 1996.

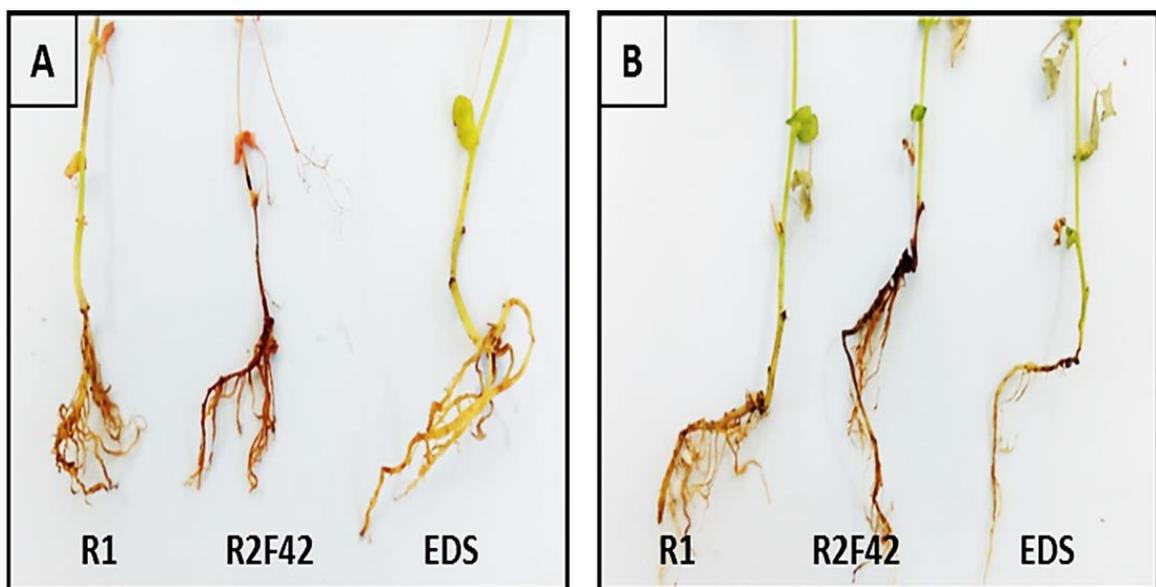


**Figure 3.14** : Comportement des géotypes, 31 jours après leur inoculation avec les souches R1 et R2F42 de Fop par rapport aux témoins (EDS).

(A) Génotype P315 et (B) génotype P691.

Bien que les deux souches de Fop aient provoqué les mêmes types de symptômes sur les génotypes (jaunissement, flétrissement, enroulement et nécrose), l'intensité des symptômes était plus importante chez les plantes inoculées avec R2F42, par rapport à la souche R1 (Figures 3.13 et 3.14). En comparant les deux souches, nous avons constaté une variabilité dans les réponses des génotypes, variant de la haute sensibilité à la résistance. Généralement, les symptômes de flétrissement progressent beaucoup plus rapidement chez les génotypes inoculés avec R2F42 qu'avec R1 (Figure 3.13).

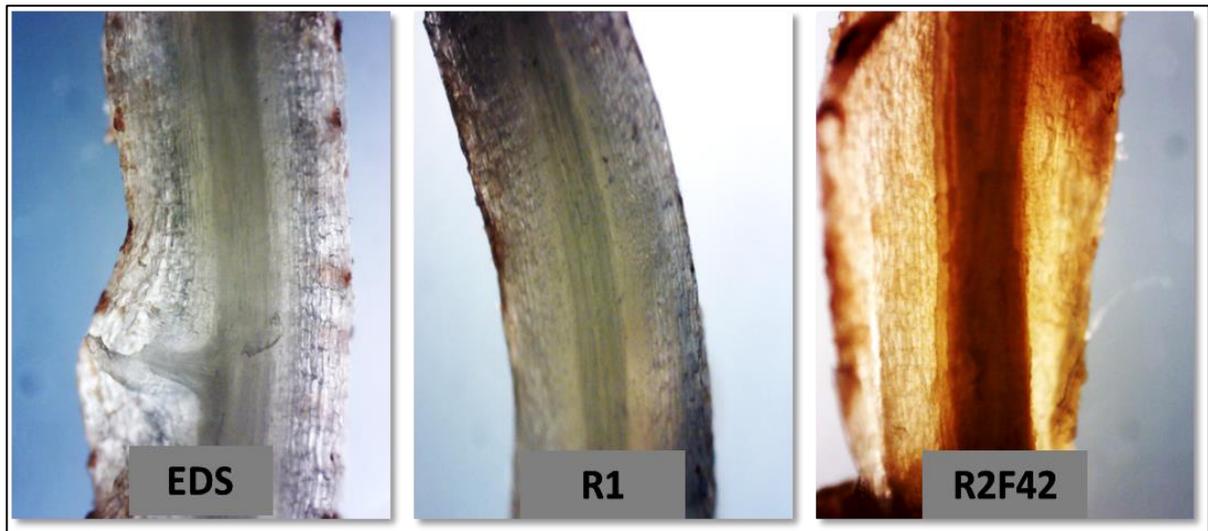
Comme pour la partie aérienne, le pathogène a causé des dégâts sur la partie racinaire. Les génotypes inoculés avec R2F42 ont montré une décoloration rouge foncé à brune aux niveaux des racines et du collet, tandis que peu de ces symptômes ont été observés chez les génotypes inoculés avec la souche R1. Concernant les témoins immergés dans l'eau distillée stérile, les racines des plantes n'ont pas montré des décolorations (Figures 3.15).



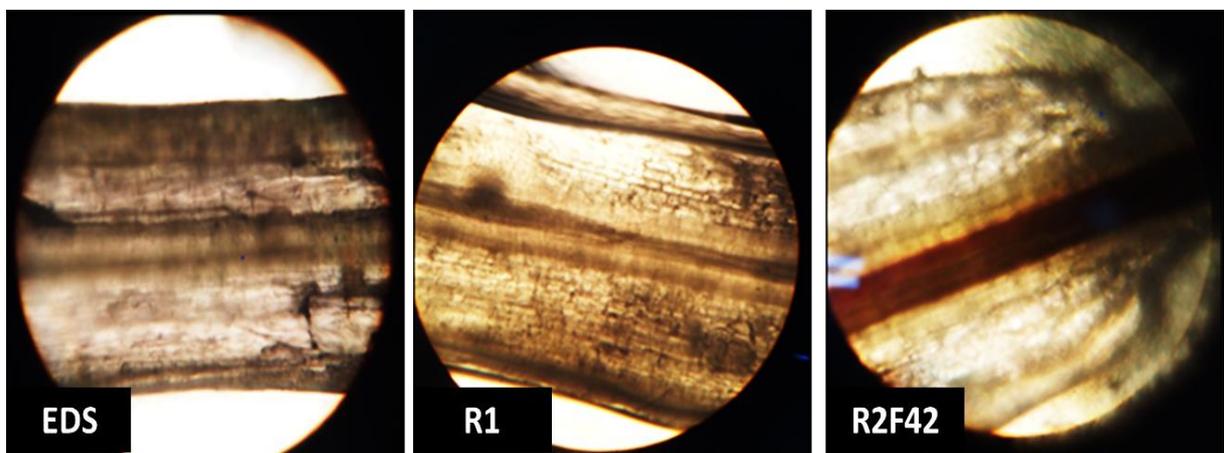
**Figure 3.15** : Aspect des racines des plantes, 31 jours après l'inoculation.

(A) Génotype 2329 et (B) génotype 3068.

L'examen microscopique a révélé, sur les coupes longitudinales fraîches de la racine et du collet, une décoloration rouge foncée du système vasculaire et/ou des tissus parenchymateux chez les génotypes sensibles (Figure 3.16) et partiellement résistants (Figure 3.17) inoculés avec la souche R2F42. Par contre, les plantes inoculées avec la souche R1 n'ont pas montré cette décoloration.



**Figure 3.16** : Symptômes internes chez le génotype P691, 31 jours après l'inoculation (G: 3,2×10).



**Figure 3.17** : Symptômes internes chez le génotype 223, 31 jours après l'inoculation (G: 10×10).

### 3.2.2. Taux d'infection

L'ANOVA des taux d'infection enregistrés par les 60 nouveaux génotypes inoculés avec les 2 souches de Fop (R1 et R2F42), a mis en évidence des différences hautement significatives ( $p=0,000$ ) (Appendice K).

En interaction avec la souche R1, les 60 génotypes peuvent être rassemblés dans deux groupes distincts (Figure 3.18):

- Le premier groupe ( $T\% \leq 50\%$ ), composé de 49 génotypes résistants : P65, 1160, P692, 1046, 2946, 801, 1171, 223, 2995, 1176, 1148, 1149, 1196, 944, 952, 1994, 1996, 2329, 2633a, 2633b, 3044, 3068, 3029, 3030, 3034, 22,

2938, 26, 27, 2017, 2342, 2372, 2367, 904, 1556, 2605, 760, 2998, P26, P39, 1066, 2310, P629, P630, P633, P648, P315, P691 et 1943.

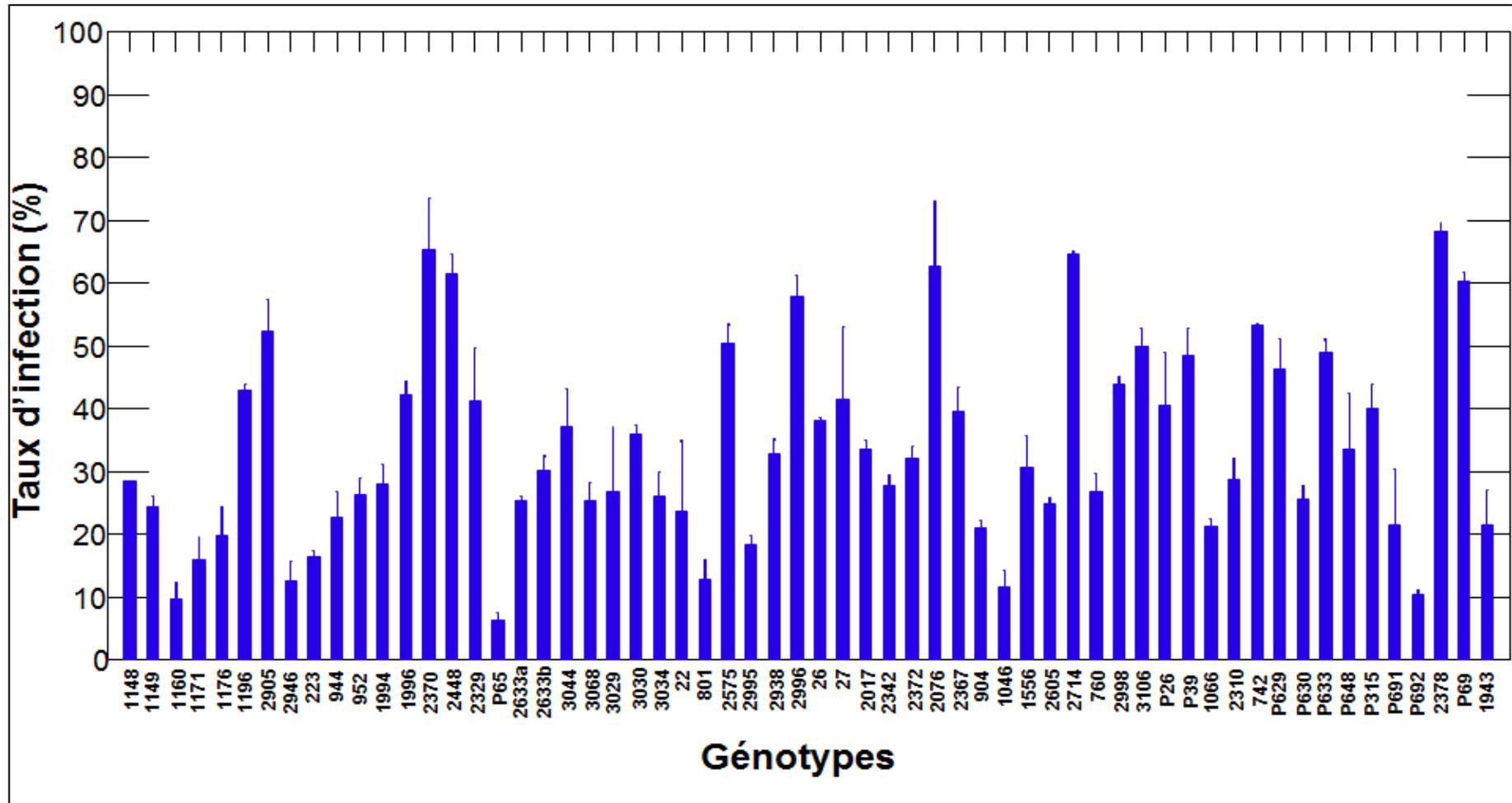
- Le deuxième groupe ( $50\% < T\% \leq 70\%$ ), rassemble 11 génotypes partiellement résistants : 2905, 2370, 2448, 2575, 2996, 2076, 2714, 3106, 742, 2378 et P69.

En interaction avec la souche R2F42, trois groupes sont distingués (Figure 3.19) :

- Le premier groupe ( $T\% \leq 50\%$ ), composé de 17 génotypes résistants : 801, P65, 2370, 3068, 1148, 1149, 952, 2633a, 2633b, 2995, 2938, 26, 2342, 2376, 1046, P39 et 2310. Le plus faible taux d'infection (10,47%) est enregistré chez le génotype 801.
- Le deuxième ( $50\% < T\% \leq 70\%$ ), composé de 16 génotypes partiellement résistants : 1196, 2905, 223, 1994, 2448, 3034, 2575, 2996, 2017, 2367, 2605, 2998, P26, 742, P630 et P633.
- Le troisième groupe ( $T\% > 70\%$ ), composé de 27 génotypes sensibles : 1160, 1171, 1176, 2946, 944, 1996, 2329, 3044, 3029, 3030, 22, 27, 2076, 904, 1556, 2714, 760, 3106, 1066, P629, P648, P315, P691, P692, 2378, P69 et 1943. La valeur maximale (88,88%) est notée chez le génotype P315.

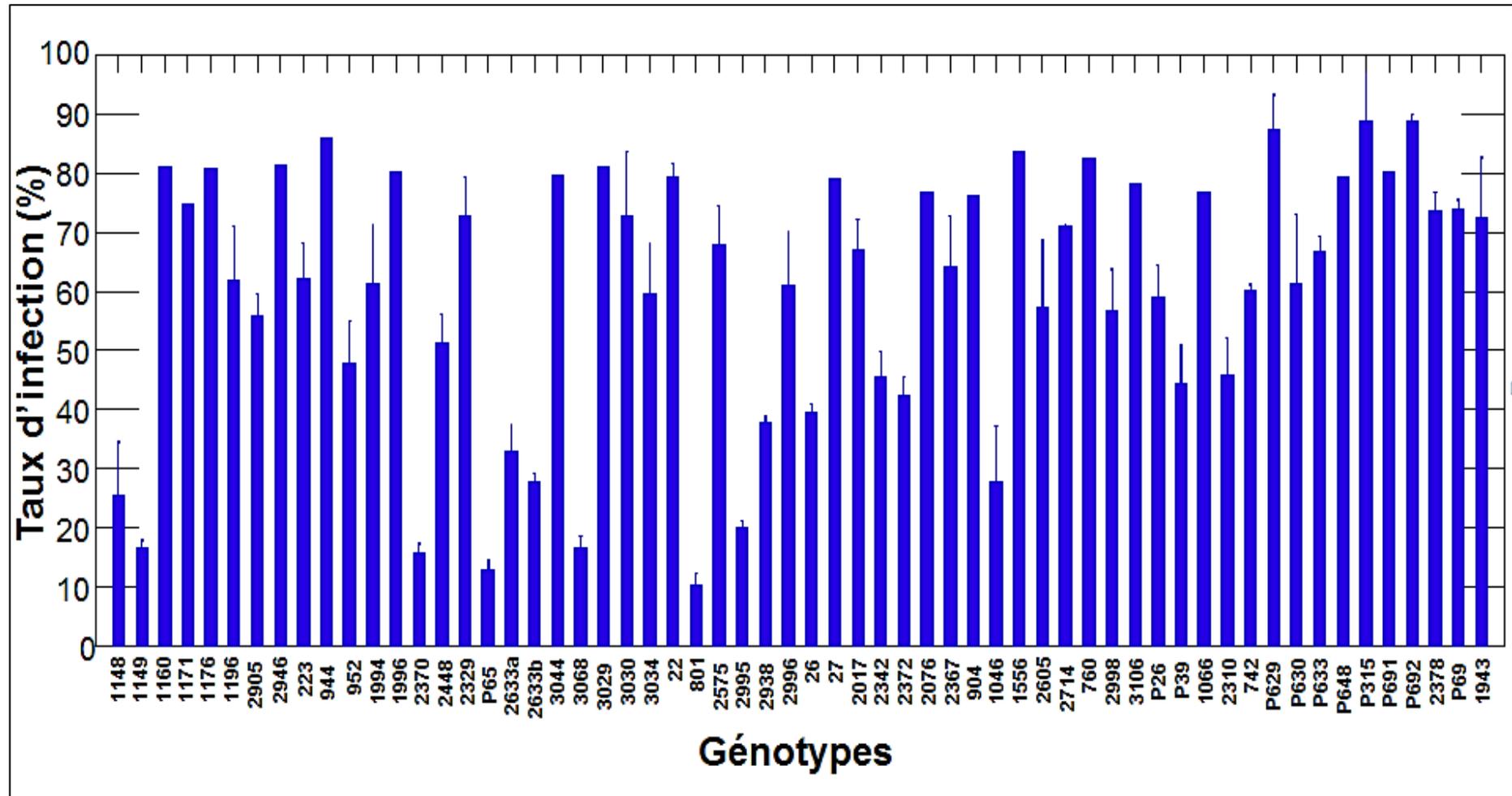
Le même génotype peut ne pas présenter le même comportement envers les deux souches de Fop. C'est le cas par exemple des génotypes 1160, 944, 27 et P692 qui sont résistants vis-à-vis de la souche R1 (Figure 3.18), alors qu'ils sont sensibles à la souche R2F42 où les taux d'infection sont supérieurs à 70% (Figure 3.19).

Avec la souche R1, parmi les 60 génotypes testés, 49 sont considérés comme résistants ( $TI\% \leq 50\%$ ) et 11 sont partiellement résistants ( $50\% < T\% \leq 70\%$ ). Face à cette souche, nous n'avons enregistré aucun génotype sensible. En interaction avec la souche R2F42, 17 génotypes sont résistants ( $TI\% \leq 50\%$ ), 16 génotypes sont partiellement résistants ( $50\% < T\% \leq 70\%$ ) et 27 génotypes sont sensibles ( $TI\% > 70\%$ ) (Figure 3.20).



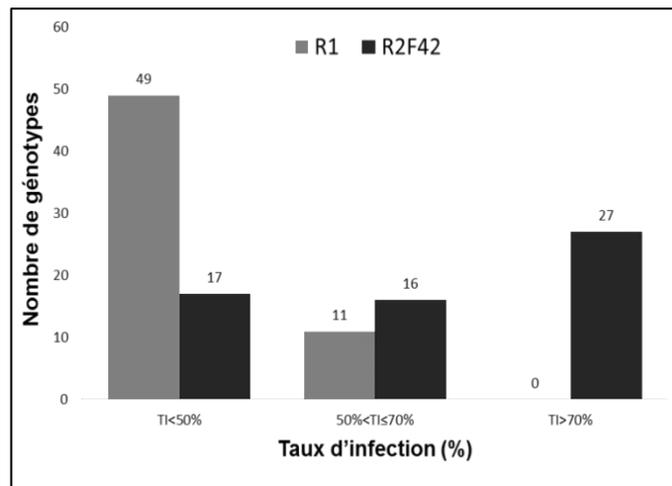
**Figure 3.18 :** Valeurs effectives du taux d'infection des 60 génotypes de pois, 31 jours après leur inoculation avec la souche R1 de Fop.

Les barres d'erreur correspondent aux écarts types issus de 5 répétitions.



**Figure 3.19 :** Valeurs effectives du taux d'infection des 60 génotypes de pois, 31 jours après leur inoculation avec la souche R2F42 de Fop.

Les barres d'erreur correspondent aux écarts types issus de 5 répétitions.



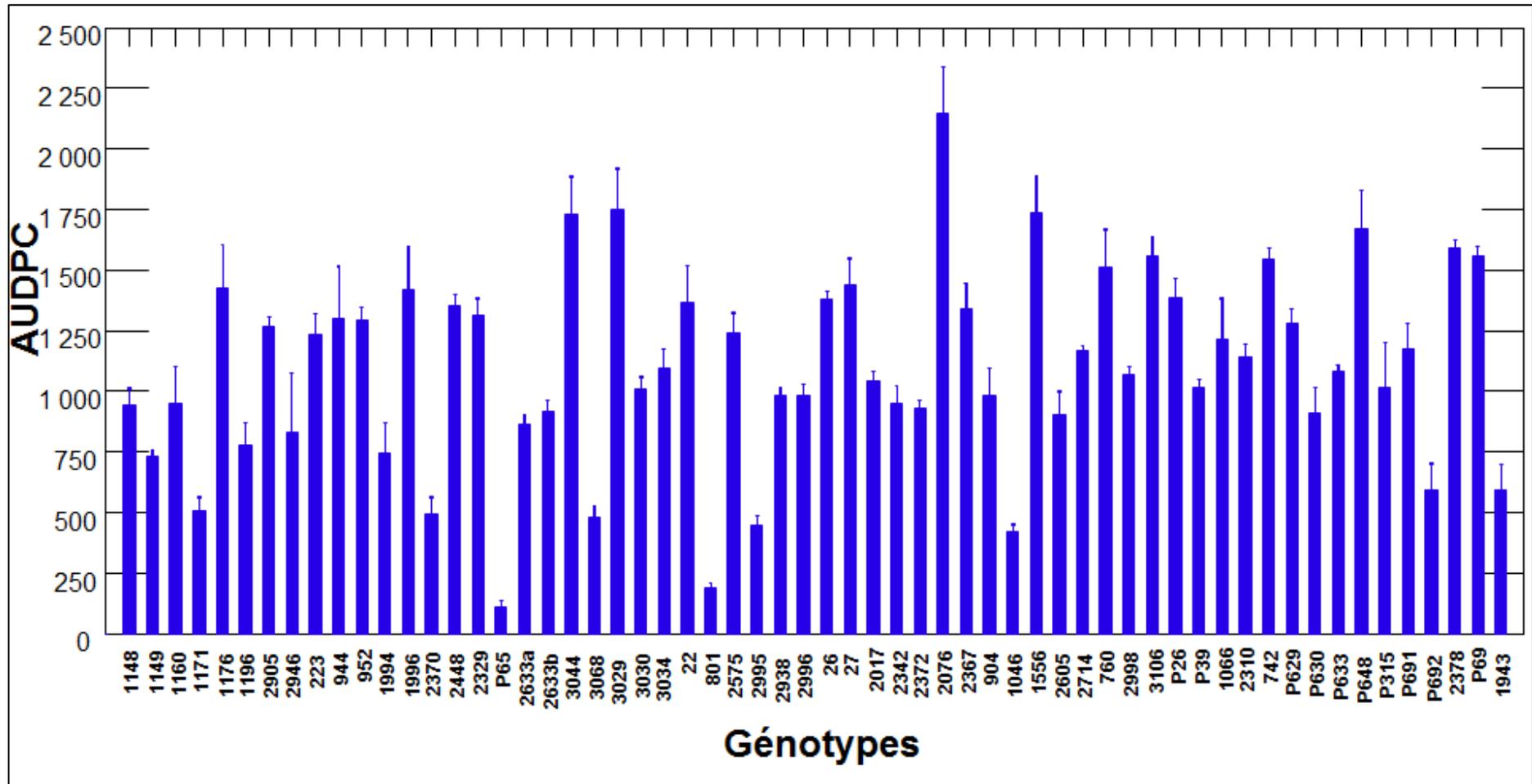
**Figure 3.20** : Répartition (nombre) de génotypes de pois par souche de Fop selon le taux d'infection.

### 3.2.3. AUDPC

L'ANOVA des valeurs AUDPC enregistrées chez les 60 nouveaux génotypes de pois face aux deux souches de Fop (R1 et R2F42), a mis en évidence des différences significatives entre les différents génotypes ( $p=0,000$ ) (Appendice K). Le calcul d'AUDPC confirme les résultats obtenus des taux d'infection, dont les génotypes résistants ont des AUDPC les plus faibles, tandis que les génotypes sensibles ont les valeurs les plus élevées (Figures 3.21 et 3.22).

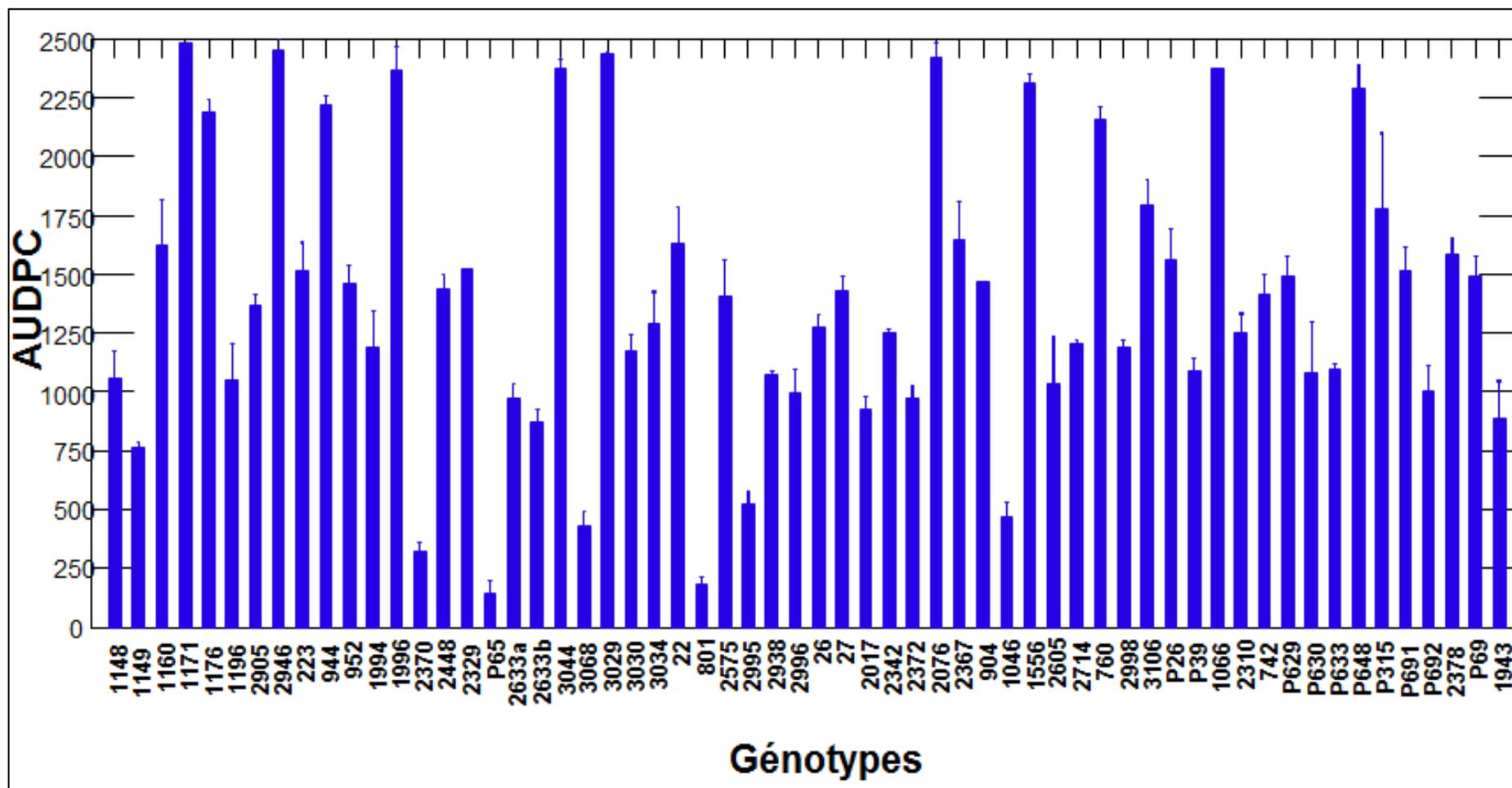
En interaction avec la souche R1, de faibles valeurs sont enregistrées par les deux génotypes résistants P65 et 801 (78,98 et 197,93, respectivement), alors que la valeur maximale de 2159,18, a été notée par le génotype 2076 (Figure 3.21). En interaction avec la souche R2F42, les valeurs d'AUDPC les plus faibles correspondant aux génotypes les plus résistants, sont enregistrées avec les deux génotypes P65 et 801 (144,14 et 178,88, respectivement). Les AUDPC les plus élevés ( $> 2150$ ) sont notés chez les génotypes sensibles 1171, 1176, 2946, 944, 1996, 3044, 3029, 2076, 1556, 760, 1066 et P648 (Figure 3.22).

De même que le taux d'infection, la valeur AUDPC du même génotype diffère selon la souche de Fop, tel le cas du génotype 1171 qui a enregistré une valeur de 503,80 avec la souche R1 (Figure 3.21) et 2494,66 avec la souche R2F42 (Figure 3.22). C'est le cas aussi du génotype 2946 qui a enregistré un AUDPC de 497,63 avec la souche R1 (Figure 3.21) et 2486,64 avec la souche R2F42 (Figure 3.22).



**Figure 3.21** : Valeurs effectives d'AUDPC des 60 génotypes de pois inoculés avec la souche R1 de Fop.

Les barres d'erreur correspondent aux écarts types issus de 5 répétitions.



**Figure 3.22** : Valeurs effectives d'AUDPC des 60 génotypes de pois inoculés avec la souche R2F42 de Fop.

Les barres d'erreur correspondent aux écarts types issus de 5 répétitions.

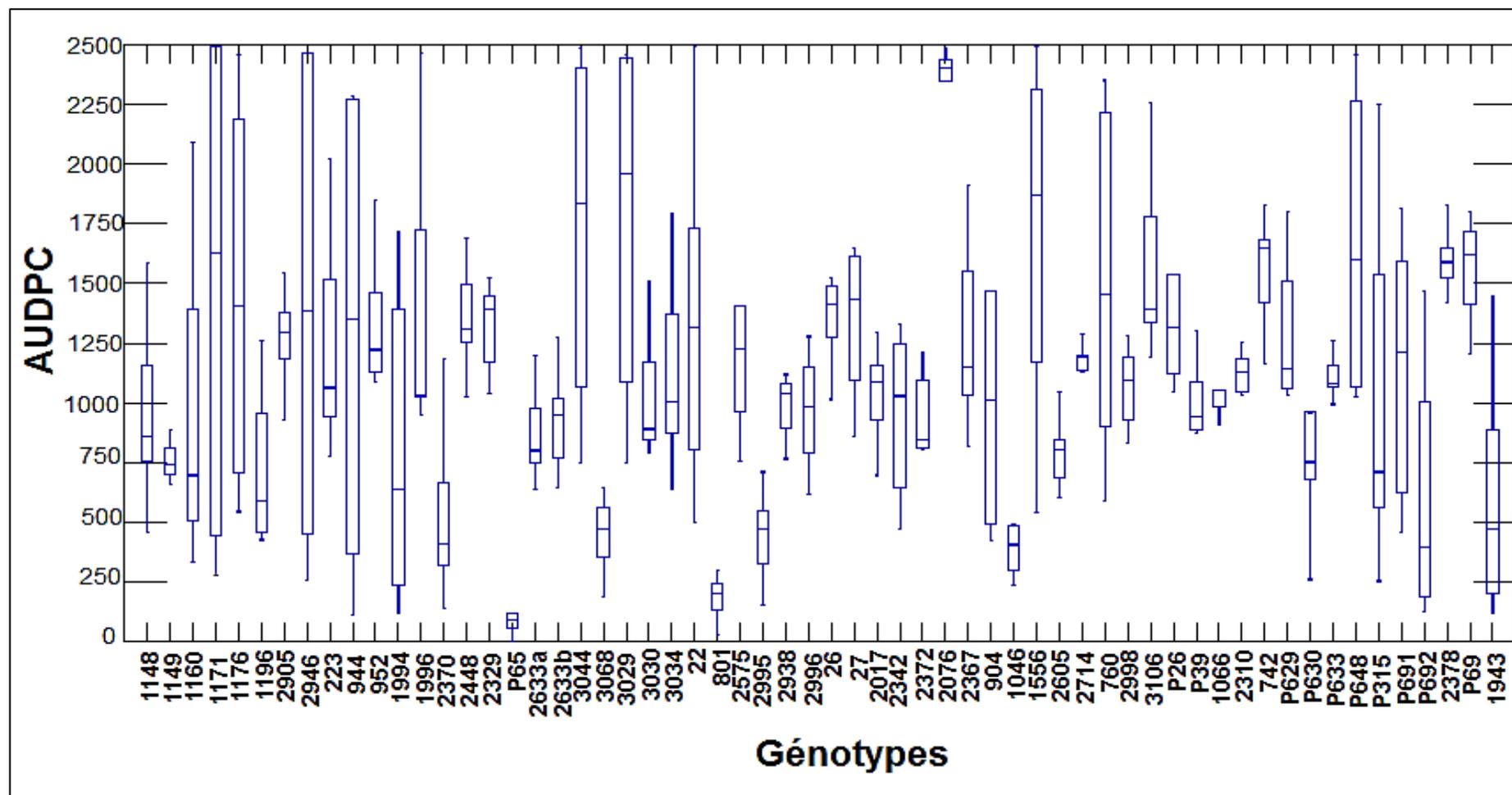


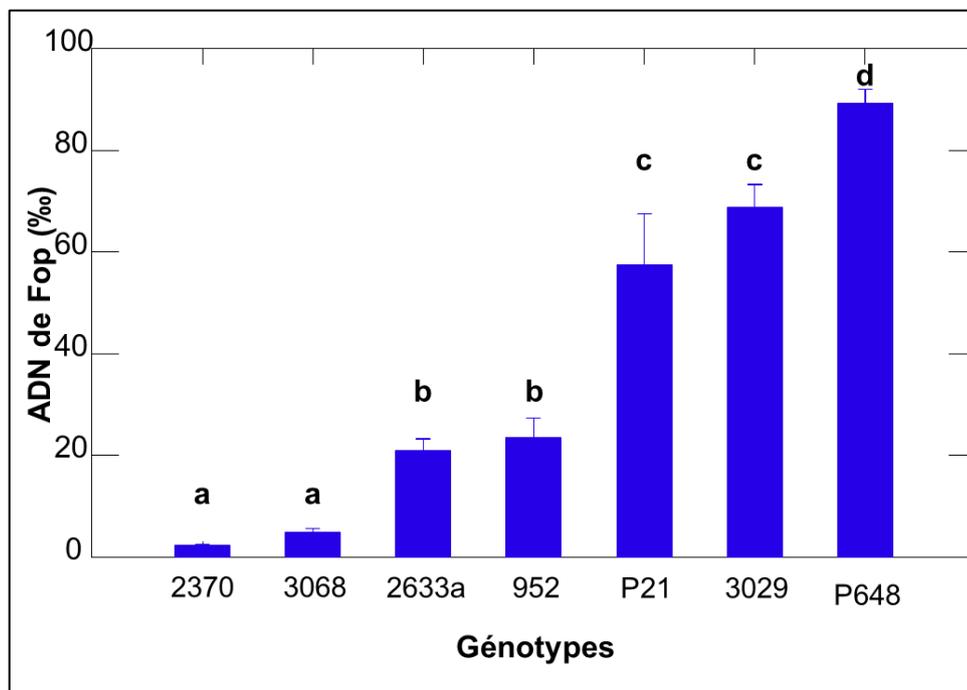
Figure 3.23 : Valeurs minimales et maximales d'AUDPC des 60 génotypes de pois.

Le calcul des valeurs minimales et maximales a mis en évidence la variabilité de réponse du même génotype face aux souches R1 et R2F42 de Fop (Figure 3.23). Des différences très importantes ont été notées chez certains génotypes, où l'écart entre la valeur minimale et maximale est très élevé. C'est le cas des génotypes 1171, 1176, 944, 3029, 1556, P648 et P691 où la différence entre les deux valeurs dépasse le seuil de 900. Par contre, certains génotypes, tels que P65, 1149, 801, 2905, 2714, P633 et 2378, ont enregistré des écarts ne dépassant pas 150 (Figure 3.23).

### 3.3. Quantification moléculaire de Fop *in planta*

L'analyse de la variance (ANOVA) révèle une différence significative entre les témoins sains (EDS) et les plants inoculés avec la souche R2F42. La quantification (RT-PCR) *in planta*, de l'ADN de la souche R2F42 de Fop, est clairement distincte des témoins qui ne présentent pas d'amplification (Appendice L).

Des différences significatives ont été détectées entre les quantités d'ADN fongique contenues dans les échantillons d'ADN des génotypes étudiés (Figure 3.24).



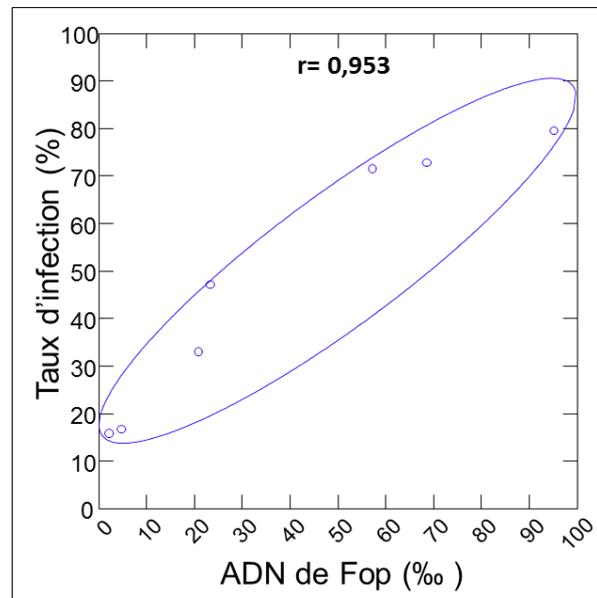
**Figure 3.24 :** Taux de l'ADN de la souche R2F42 de Fop par rapport à l'ADN total selon le génotype du pois.

a, b, c et d : la même lettre indique l'absence de différences significatives. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types issus de 3 répétitions.

La quantité de l'ADN de Fop amplifiée par RT-PCR, a été exprimée en taux pour mille (‰) par rapport à l'ADN total extrait. Selon les taux enregistrés, quatre groupes sont distingués (Figure 3.24) :

- Le groupe « a » avec les taux les plus faibles composé de deux génotypes 2370 (2,32‰) et 3068 (4,88‰).
- Le groupe « b » composé des deux génotypes 2633a et 952 qui ont enregistré des taux d'ADN fongique ne dépassant pas 24‰ (20,97‰, et 23,51‰ respectivement).
- Le groupe « c » composé des génotypes P21 et 3029, avec respectivement 57,32‰ et 68,69‰ d'ADN de Fop.
- Le groupe « d » composé du seul génotype P648 qui a montré le taux d'ADN fongique le plus élevé (95,32‰).

La quantité de l'ADN de Fop mesurée *in planta* est positivement corrélée avec les niveaux du taux d'infection enregistrés par chaque génotype ( $r=0,953$ ) (Figure 3.25).



**Figure 3.25** : Corrélation entre le taux d'ADN de Fop et le taux d'infection enregistré par les génotypes de pois étudiés.

Sur la base de ces résultats, nous constatons que Fop est faiblement présent dans les tissus végétaux des génotypes résistants 2370 et 3068, correspondant aux taux d'infections 15,7% et 16,57%. C'est le cas aussi des génotypes 2633a et 952 ayant des taux d'infection de 32,91% et 47,85%, respectivement. Quant au génotype

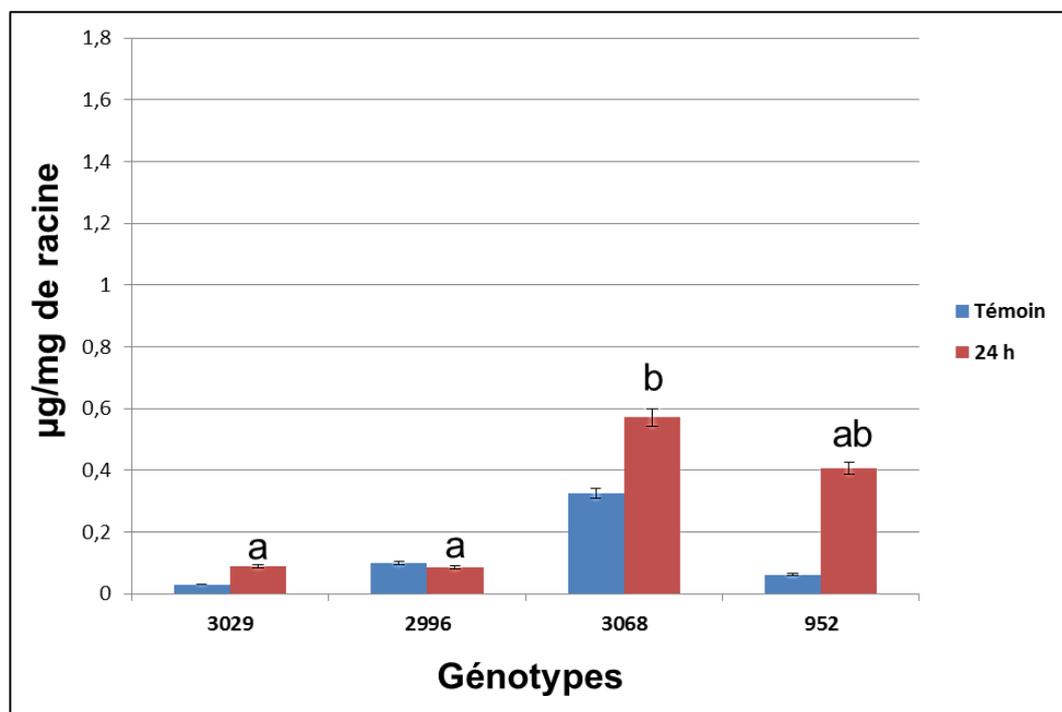
partiellement résistant P21 (TI%=64,45%), il a enregistré un taux de 57,32‰ d'ADN de Fop. Les deux génotypes sensibles 3029 et P648 (TI% > 70%), ont enregistré le taux d'ADN de Fop le plus important.

### 3.4. Dosage de la pisatine

Les chromatogrammes obtenus (HPLC) ne montrent aucun changement qualitatif entre génotypes ou traitements, ce qui exclut la possibilité de présence de composés différents (Appendice M). La teneur en pisatine est mesurée en µg/mg d'extrait (Appendice O) ou en µg/mg de poids frais de la racine, suivant la courbe d'étalonnage préalablement établie (Appendice M). L'analyse de la variance des teneurs en pisatine indique une différence significative entre les génotypes et entre les différents traitements (appendice N).

#### 3.4.1. Après 24h de l'inoculation

Après 24h de l'inoculation avec la souche R2F42, le dosage de la pisatine a révélé que la teneur en cette phytoalexine chez les plantes inoculées était plus importante que chez les témoins, à l'exception du génotype 2996 où le témoin a montré une teneur légèrement plus élevée que les plantes inoculées (Figure 3.26).



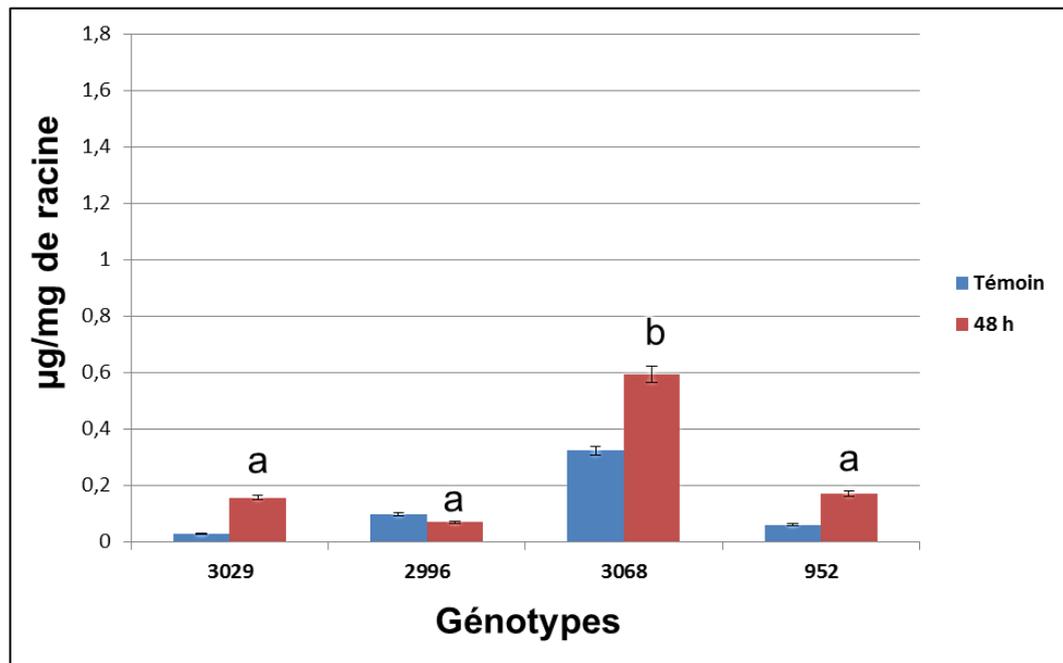
**Figure 3.26** : Teneur en pisatine 24 heures après l'inoculation.

a, b, et ab : la même lettre indique l'absence de différences significatives. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types issus de 3 répétitions.

La quantité de pisatine accumulée chez les deux génotypes résistants 3068 et 952, exprimée en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de racine, semble la plus importante ( $0,57 \mu\text{g}/\text{mg}$  et  $0,4 \mu\text{g}/\text{mg}$ , respectivement). Chez le génotype partiellement résistant 2996 et le génotype sensible 3029, les teneurs en pisatine sont relativement plus faibles ( $0,08 \mu\text{g}/\text{mg}$  et  $0,09 \mu\text{g}/\text{mg}$ , respectivement) (Figure 3.26).

#### 3.4.2. Après 48h de l'inoculation

Après 48h de l'inoculation, la teneur en pisatine la plus élevée ( $0,59 \mu\text{g}/\text{mg}$  de racine) est enregistrée chez le génotype résistant 3068. Le génotype résistant 952 a montré une teneur de  $0,17 \mu\text{g}/\text{mg}$ , suivi par le génotype sensible 3029 ( $0,15 \mu\text{g}/\text{mg}$ ). Le génotype partiellement résistant 2996 a accumulé la quantité de pisatine la plus faible ( $0,07 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) (Figure 3.27).

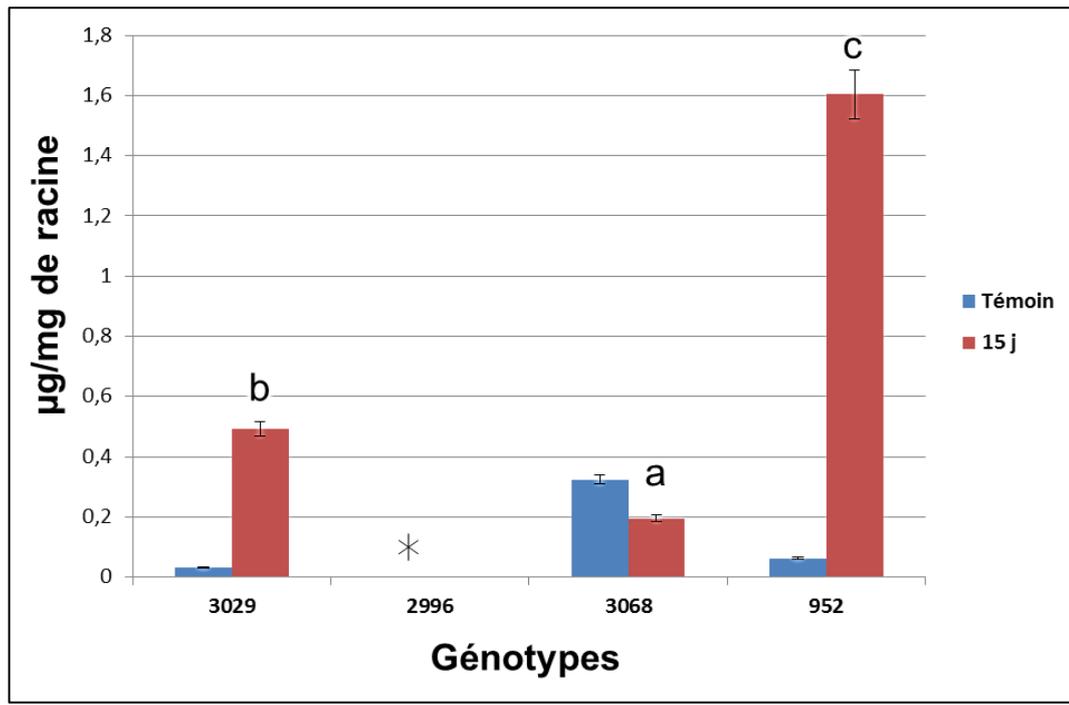


**Figure 3.27** : Teneur en pisatine 48 heures après l'inoculation.

a et b : la même lettre indique l'absence de différences significatives. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types issus de 3 répétitions.

#### 3.4.3. Après 15 jours de l'inoculation

15 jours après l'inoculation, le génotype résistant 952 a accumulé la teneur en pisatine la plus importante en enregistrant  $1,6 \mu\text{g}/\text{mg}$  de racine. Le génotype sensible 3029 a enregistré  $0,49 \mu\text{g}/\text{mg}$ , dépassant ainsi le génotype résistant 3068 avec  $0,19 \mu\text{g}/\text{mg}$  (Figure 3.28).

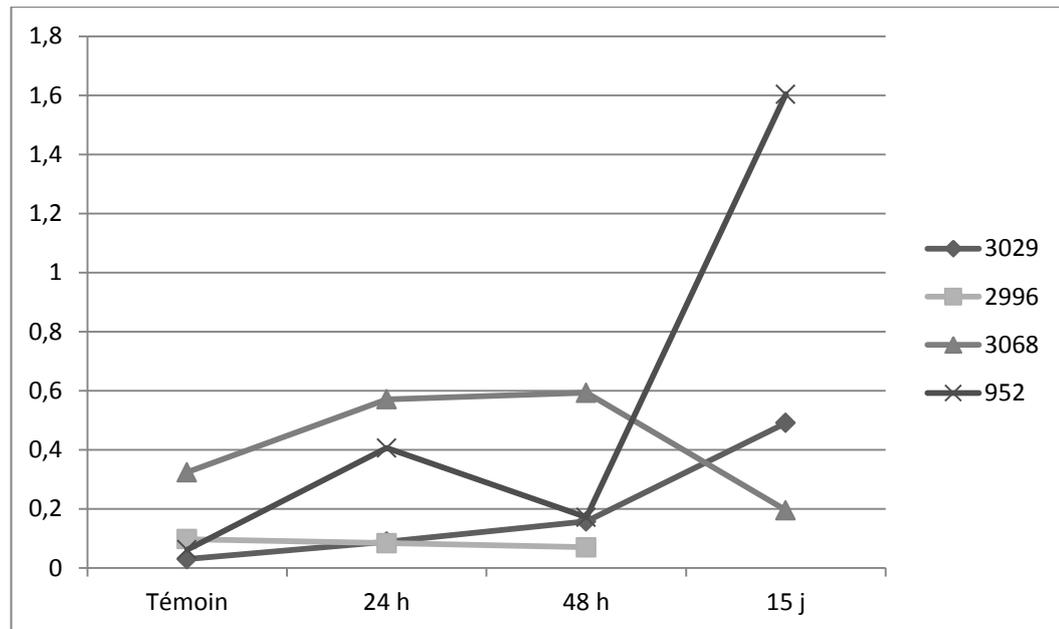


**Figure 3.28** : Teneur en pisatine 15 jours après l'inoculation.

a, b, et c : la même lettre indique l'absence de différences significatives. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types issus de 3 répétitions. (\*) : Traitement manquant.

L'analyse de la variance (ANOVA) indique aussi une différence significative entre traitements (témoins, 24h, 48h et 15 jours après l'inoculation) (Figure 3.29) :

- Chez le génotype résistant 952, la quantité de pisatine augmente après 24h de l'inoculation et redescend à 48h, pour ré-augmenter et enregistrer son maximum après 15 jours de l'inoculation.
- Chez le génotype résistant 3068, l'accumulation de la pisatine a augmenté 24 heures après son inoculation pour atteindre sa valeur maximale après 48, en enregistrant par la suite une diminution de sa teneur après 15 jours de l'inoculation.
- Chez le génotype partiellement résistant 2996, nous avons noté une diminution progressive de la quantité de pisatine.
- Chez le génotype sensible 3029, une augmentation continue de la teneur en pisatine a été enregistrée.



**Figure 3.29** : Evolution de la teneur en pisatine des génotypes de pois étudiés.

Les barres d'erreur correspondent aux écarts types issus de 3 répétitions. (\*) : Traitement manquant.

### 3.5. Discussion

La fusariose vasculaire du pois causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (Fop), est une redoutable maladie pouvant provoquer de graves pertes [11, 12]. Pour lutter contre cette trachémycose, certains fongicides peuvent être utilisés, néanmoins leur efficacité est relativement limitée, en raison des capacités de conservation du pathogène dans le sol et sur les débris végétaux et sa progression systémique vasculaire qui est quasiment hors d'atteinte. En plus, ces dernières années, il y a mépris envers les produits agrochimiques à cause de leurs effets néfastes sur la santé et sur la microflore bénéfique du sol [12, 237, 238]. Les méthodes de lutte biologique sont des sources prometteuses de contrôle et trouvent des échos très favorables auprès des agriculteurs et des consommateurs. Cependant, la commercialisation des biopesticides demeure très limitée à cause de la complexité de leur production à l'échelle industrielle et leur inadéquation avec les pratiques agronomiques courantes [239].

La sélection de cultivars résistants, même si les approches analytiques et méthodologiques sont fastidieuses, toutefois il est largement reconnue qu'il s'agit de solutions sûres et plus durables [22, 240]. Des sources de résistance à la fusariose vasculaire du pois ont été identifiées et sont utilisées pour améliorer les variétés cultivées [20, 21]. La recherche de nouvelles sources de résistance aux stress,

biotiques et abiotiques, ainsi que la détermination de leurs mécanismes de défense sont une étape fondamentale pour une exploitation pratique.

Notre étude a évalué les niveaux de résistance/sensibilité d'une collection de génotypes de pois, exécutée en deux phases : la première s'intéresse à l'étude du comportement de 28 génotypes face à quatre souches de Fop, suivie par 60 autres génotypes face à 2 souches du pathogène. Dans ce genre d'études, certes la recherche de déterminants moléculaires et/ou biochimiques, régissant la résistance des plantes aux bioagresseurs est essentielle, néanmoins l'expression phénotypique reste une étape primordiale, permettant la confirmation et l'évaluation des comportements génotypiques. Ainsi, dans le cas de notre pathosystème, la typicité symptomatique, notamment avec la diversité du même pathogène, à travers ses races, constitue un moyen permettant d'évaluer le comportement du génotype végétal vis-à-vis du degré de virulence du pathogène.

La fusariose vasculaire cause un ensemble de symptômes externes, incluant l'éclaircissement des nervures, l'enroulement des feuilles, le flétrissement, le jaunissement, les nécroses et la mort de la plante [113]. Les quatre souches de Fop ont provoqué ce même tableau symptomatologique sur les génotypes étudiés. Dans nos essais, en conditions semi-contrôlées, nous avons constaté que la souche R2F42 est la plus virulente, causant des symptômes plus intenses sur les génotypes sensibles et partiellement résistants (Messire, P21, P634, P669, 944, P315 et P691).

Pour une même souche, la réponse de chaque génotype était très variable. Généralement, les symptômes de flétrissement progressent beaucoup plus rapidement chez les génotypes Messire, P21, 2946, 944 et P692, que chez d'autres comme par exemple les génotypes Radley, Merveille de Kelvedon, P665, 801 et P65. Ces symptômes peuvent être le résultat d'un déficit hydrique dû à l'occlusion des vaisseaux générée par l'infection [113]. Dans le cas des fusarioses vasculaires, il se produit souvent la combinaison de la condensation du mycélium dans les cellules du xylème et/ou la production de toxines, causant ainsi le flétrissement des plantes atteintes et leur mort subséquente [94, 192, 241, 242, 243]. Le blocage de la circulation normale de la sève, chez les génotypes sensibles, peut être dû à l'obstruction du système vasculaire et des cellules du xylème. Ainsi, la formation de telle obstruction a été supposée pour être la conséquence d'une réaction défensive retardée survenant dans la tige des plantes sensibles [244]. De plus, la production de

la gomme par la plante par l'action d'une pectinase fongique a également été suggérée pour être l'origine de ces occlusions vasculaires [192, 241].

En parallèle aux symptômes externes, l'infection du pois par Fop est généralement associée avec une décoloration des tissus vasculaires qui deviennent rouge-orange ou noirs. Chez les plantes sensibles, cette décoloration vasculaire progresse de la racine vers la tige et elle est généralement plus intense en réponse à la race 2 du champignon [11, 20, 245]. Dans notre travail, le tissu vasculaire de la plupart des génotypes étudiés inoculés par les souches R2F42, Arg1 et Arg3, a viré vers une couleur rouge foncé.

La plupart des travaux sur la résistance du pois à la fusariose vasculaire, prennent en considération le taux d'infection et la sévérité des symptômes en tant que paramètres distinctifs [20, 21, 232]. Ainsi, nous avons utilisé ces paramètres pour différencier les réponses des deux collections de *Pisum* spp. Les différentes méthodes d'évaluation de la maladie (taux d'infection, VIS et AUDPC) ont révélé une grande variabilité chez les interactions étudiées (souches de Fop x génotypes du pois).

Suivant la classification établie par MCPHEE *et al.* [231], les 28 génotypes de la première collection sont tous résistants aux souches R1, Arg1 et Agr3, où les taux d'infection ne dépassent pas 50%, tandis qu'en interaction avec la souche R2F42, 23 génotypes sont résistants. Chez la deuxième collection, 49 nouvelles sources de résistance, à la souche R1 sont identifiées, tandis qu'en interaction avec la souche R2F42, 17 nouvelles sources de résistance sont déterminées.

D'après INFANTINO *et al.* [14], le taux d'infection seul apparaît insuffisant pour distinguer les réponses des génotypes étudiés. Afin de décrire correctement les réactions des 28 génotypes de la première collection, en interaction avec les quatre souches de Fop, nous avons complété le calcul des taux d'infection par une évaluation de la sévérité des symptômes (VIS). Ce dernier a été adopté dans plusieurs études pour évaluer la résistance vis-à-vis de la fusariose vasculaire [20, 232, 242, 246, 247, 248]. Donc, l'utilisation de l'échelle de sévérité des symptômes a apporté une meilleure quantification de la maladie, car elle considère les symptômes au niveau de la feuille et donne une meilleure idée de la proportion affectée chez la plante, reflétant ainsi le degré d'expression quantitative de la maladie.

Le calcul des VIS a confirmé les résultats obtenus en taux d'infection, où les deux paramètres sont positivement corrélés ( $r=0.906$ ). En effet, les valeurs VIS les plus importantes correspondent aux taux d'infection les plus élevées. Afin de déterminer la méthode de notation la plus adaptée et la plus simple pour évaluer la fusariose vasculaire, BANI *et al.*, [20] ont aussi étudié la corrélation entre les différents paramètres. D'après leur étude, une forte corrélation entre VIS et taux d'infection ( $r=0,925$ ), suggère l'utilisation de l'un des deux paramètres seulement pour déterminer le niveau de résistance/sensibilité des génotypes de pois face à la fusariose vasculaire.

Restreindre l'évaluation de la maladie aux seules valeurs du taux d'infection et de VIS finaux semble loin de refléter les détails du développement et d'évolution de la fusariose vasculaire. Pour cela, nous avons calculé l'AUDPC, car ce paramètre évalue la progression de la maladie dans le temps [233, 249].

Les différentes méthodes d'évaluation de la maladie utilisées dans ce travail, nous ont permis de distinguer les réponses des différents génotypes face aux souches phytopathogènes de Fop. La résistance ou la susceptibilité d'un génotype donné est relative à la souche de Fop utilisée. C'est le cas par exemple du génotype Merveille de Kelvedon qui a enregistré une valeur effective d'AUDPC de 584,52 avec la souche R1, alors qu'il a enregistré une valeur de 36,64 avec la souche Arg1. Cette variabilité, envers les différentes souches du même pathogène, peut être la conséquence d'une spécificité du biotype pathogène vis-à-vis des différents cultivars de la même espèce hôte. Les relations entre les agents pathogènes et leurs hôtes végétaux sont déterminées au niveau d'entités génétiques, représentées d'une part par les biotypes (pathotypes ou races) des parasites et d'autre part par les cultivars des plantes. Une des manifestations les plus connues de la spécificité parasitaire est la résistance dite verticale : la variété concernée résiste totalement à certaines souches du parasite mais elle est sensible à d'autres, manifestant ainsi une interaction différentielle. Tout biotype du parasite qui est capable de surmonter un facteur de résistance verticale est dit virulent à l'égard du cultivar correspondant [250].

Au sein des deux collections du pois étudiées, 3 types de comportement ont été enregistrés : des génotypes sont sensibles à la maladie, des génotypes qui sont partiellement résistants et d'autres qui sont résistants. L'étude menée par BANI *et al.*, [20], a révélé une variabilité de réponses de 73 génotypes de *Pisum* spp. face à

la souche R2F42 de Fop, qui ont varié entre résistance et susceptibilité, avec des génotypes à résistance partielle. De telle variabilité de réponses suggère que la résistance de la collection étudiée de *Pisum* spp. à cette souche de Fop est de nature quantitative. Cette dernière peut se référer à un niveau incomplet ou partiel du phénotype de résistance, permettant au pathogène de se reproduire et de se propager. Elle est polygénique impliquant plusieurs gènes, dont chacun contribue à un faible niveau de résistance [157].

Parmi les quatre souches utilisées de Fop, R2F42 a été la plus virulente en enregistrant des valeurs du taux d'infection, de VIS et d'AUDPC les plus importantes, suivie par la souche R1 puis les deux souches Arg1 et Arg3. Une étude sur la pathogénicité de 5 souches de Fop (incluant les deux souches R2F42 et Arg3), a révélé le rôle majeur des toxines, telles que l'acide fusarique et l'acide 9,10-déhydrofusarique, dans la pathogénicité et la virulence de Fop [101].

La colonisation de l'hôte est l'une des étapes cruciales de la pathogénèse, où le pathogène doit gagner l'intérieur de la plante pour qu'il puisse compléter son cycle infectieux. Pour quantifier les agents pathogènes *in planta*, la plupart des méthodes moléculaires développées sont basées sur la détection par PCR de l'ADN du pathogène. Ces méthodes fournissent la possibilité de détecter de très petites quantités de microorganismes [251]. Dans notre travail, nous avons effectué une quantification moléculaire de l'ADN de Fop dans les tissus de 7 génotypes de pois inoculés avec la souche R2F42. La quantité de l'ADN de Fop par rapport à l'ADN total des échantillons a été mise en évidence par une PCR quantitative en temps réel. Le taux de l'ADN de Fop est positivement corrélé avec le taux d'infection enregistré chez les génotypes étudiés ( $r=0,953$ ). En effet, les génotypes sensibles ont montré des taux d'ADN élevés, reflétant ainsi que la colonisation des tissus végétaux par Fop est plus importante chez les génotypes sensibles par rapport aux génotypes résistants. Des recherches sur le pathosystème pois-Fop ont montré que l'invasion interne des racines pivotantes et des hypocotyles était moins fréquente chez le cultivar « Vantage », qui possède le gène de résistance à la race 1, que chez le cultivar sensible « M410 » [252]. En outre, pour mettre en évidence la colonisation des plants de pois par Fop, BANI *et al.* ont essayé de ré-isoler les colonies du champignon à partir des différentes parties de la plante. Les colonies ont été détectées dans les racines de tous les génotypes (résistants, partiellement résistants et sensibles). Cependant, les colonies fongiques n'ont été récupérées qu'à partir des

tiges des génotypes sensibles, suggérant ainsi que la propagation de Fop a été délimitée chez les génotypes résistants [20]. ULLOA *et al.* ont montré aussi que les génotypes résistants empêchent le champignon d'achever la colonisation du xylème à partir de la racine pivotante [248].

Dans l'interaction de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* avec des génotypes de tomate, VAN DER DOES *et al.* ont démontré que le champignon colonise à la fois le xylème de la racine et de la tige chez les plantes résistantes, ce qui suggère qu'il peut être considéré comme un endophyte sur un génotype végétal résistant, dont il colonise l'hôte mais ne provoque pas de symptômes [253]. Dans cette même étude, il a été révélé que le champignon était capable d'atteindre le système vasculaire de la tige des génotypes résistants. Cependant, l'extension de la colonisation du système vasculaire de l'hôte était inférieure à celle des plantes sensibles. Cela indique que le blocage complet de la pénétration fongique ne se produit pas forcément lors des interactions incompatibles [253]. Ces aboutissements s'accordent avec nos résultats, où les génotypes résistants de *Pisum* spp. contenaient l'ADN de Fop au niveau du collet mais à de faibles quantités, contrairement aux génotypes sensibles.

La résistance à *F. oxysporum* chez plusieurs espèces végétales a été largement étudiée. Plusieurs travaux montrent que les souches de ce pathogène sont capables de coloniser l'intérieur de la plante malgré la présence d'une réponse fonctionnelle de résistance. C'est le cas par exemple de l'interaction incompatible de ce champignon avec le haricot, où certaines souches colonisent la plante des racines jusqu'à la région basale de la tige [254, 255], alors que la colonisation des génotypes résistants de pois ou de pastèque est limitée aux racines et parfois aux collets [20, 256]. En outre, SCOTT *et al.* ont démontré que des souches phytopathogènes de *F. oxysporum* peuvent coloniser les tissus de la plante sans causer la maladie [257].

L'invasion et la colonisation de l'hôte par *F. oxysporum* dépend de plusieurs facteurs variant selon le pathosystème. De même, l'hôte développe différentes barrières physiques et chimiques pour bloquer la progression du pathogène à différents niveaux en fonction de l'espèce hôte ou du cultivar. Les mécanismes les plus efficaces sont la production de composés antifongiques, la formation de papilles aux sites de pénétration, la subérisation et la lignification des parois cellulaires, l'accumulation de gommages, de gels ou de tyloses dans les cellules du xylème et

l'occlusion des vaisseaux par prolifération de cellules adjacentes de parenchyme [192, 242, 258, 259, 260, 261, 262, 263]. Chez le pois, une protéine antifongique de 31 kDa, a été isolée chez la variété macrocarpon de *P. sativum*. La protéine, appelée pisumine, a montré une activité antifongique envers *F. oxysporum* et *Rhizoctonia solani* [264]. Une autre protéine antifongique de 11 kDa, a été aussi isolée à partir des graines de *P. sativum* var. *arvense* Poir, ayant une activité inhibitrice envers *F. oxysporum* [265].

Ces différents mécanismes contribuent à bloquer la progression du pathogène et à détruire les hyphes invasives. Bien que plusieurs de ces mécanismes soient souvent décrits simultanément dans la racine de l'hôte, leur contribution relative à la résistance varie selon l'hôte et le cultivar [235]. Chez le pois, des études ont montré que le principal déterminant de la résistance au Fop est l'occlusion des tissus du xylème, le renforcement de la paroi cellulaire des vaisseaux et la production de la pisatine [235, 244, 266, 267].

La pisatine est la principale phytoalexine de pois induite en réponse à des agents pathogènes, dont elle est un métabolite antifongique puissant [268, 269, 270, 271, 272]. Elle a été identifiée comme le principal composant de la fraction inhibitrice présente dans les exsudats des génotypes du pois [235].

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons réalisé le dosage de la pisatine (HPLC) chez quatre génotypes de pois, après leur inoculation avec la souche R2F42 de Fop. Les génotypes résistants et partiellement résistants présentent généralement une teneur en pisatine plus importante par rapport aux génotypes susceptibles. Ce constat indique que la pisatine joue un rôle important dans la défense de ces génotypes face à Fop. Comme le génotype partiellement résistant 2996 ne possède qu'une très petite quantité de pisatine, qui n'évolue pas avec le temps, certains génotypes doivent mettre en place d'autres mécanismes de défense [235]. Dans notre étude, les génotypes résistants contiennent plus de pisatine au moment de l'infection et répondent rapidement à l'invasion fongique, en augmentant transitoirement la quantité de pisatine 24h après l'inoculation. Ces résultats indiquent que la pisatine joue un rôle très important dans les réactions défensives des génotypes 3068 et 952. De ce fait, la résistance de ces deux génotypes est due, au moins en partie, à la synthèse massive de pisatine et à son accumulation rapide pendant les premières 24h, suivant leur inoculation.

Les résultats semblent aussi indiquer un rôle de la pisatine dans la réaction défensive responsable de la résistance partielle. En effet, si le génotype 2996 ne montre pas de différence significative avec le génotype susceptible 3029 durant les premières 48h, l'accumulation de pisatine dans les racines infectées durant la période suivante doit permettre de limiter la croissance du pathogène, ralentissant ainsi la colonisation de la plante hôte et le développement de la maladie.

Bien que des études antérieures ont signalé que la pisatine inhibait la croissance de *F. oxysporum* dans un intervalle de 25 à 100 µg/ml dans des essais biologiques *in vitro* [268, 270], l'étude menée par BANI *et al.* a prouvé qu'elle peut inhiber la germination de Fop à une concentration beaucoup plus faible [235]. L'efficacité des phytoalexines en tant que composés de défense peut être déterminée par la présence ou l'absence de composés qui influencent leur activité antimicrobienne selon les plantes [203]. Une bonne corrélation entre la quantité de phytoalexine susceptible d'être en contact avec l'agent pathogène et la toxicité *in vitro* est essentielle pour déterminer le rôle d'une phytoalexine dans la défense [273].

15 jours après l'inoculation, une augmentation très importante de la teneur en pisatine chez le génotype résistant 952, mais aussi chez le génotype sensible 3029. Par contre, une réduction notable de la pisatine a été enregistrée chez le génotype partiellement résistant 2996, indiquant ainsi que son accumulation tardive peut avoir un rôle renforçant la défense chez les génotypes résistants mais pas chez les génotypes sensibles. Les résultats obtenus dans notre travail semblent, donc, indiquer deux fonctions de la pisatine dans la réaction défensive : une réaction rapide et précoce permettant une résistance complète à l'infection et une autre plus tardive permettant une résistance partielle.

La synthèse d'une phytoalexine se produit *de novo* suite à une infection pathogène et diffère entre les interactions compatibles et incompatibles dans la dynamique de leur biosynthèse, plutôt que dans la présence/absence dans les plantes hôtes résistantes ou sensibles [203, 204, 205]. Par conséquent, le succès général de cette réaction de défense repose sur sa dynamique, qui est déterminée par le répertoire génétique de l'hôte [274].

La souche R2F42 de Fop utilisée dans notre travail a induit la maladie chez le génotype sensible 3029, malgré l'accumulation croissante de la pisatine dans ses racines. CRUICKSHANK a indiqué que la tolérance à une phytoalexine pourrait être

un caractère de pathogénicité [275]. En 1964, UEHARA a rapporté que deux agents pathogènes du pois étaient capables de dégrader la pisatine par déméthylation comme mécanisme de détoxification [276]. Des analogues de gènes de la famille PDA (*Pisatin Demethylating Ability*) présents chez l'agent phytopathogène de pois *Nectria haematococca*, ont été isolés et identifiés chez *F. oxysporum* [277, 278].

Pour développer des outils de protection des plantes, les travaux ont été longtemps dirigés sur la génération de pesticides ou sur les investigations moléculaires des autres mécanismes de défense, autres que les phytoalexines. Cela peut également être dû à l'extrême diversité des phytoalexines et la complexité de la biosynthèse pour beaucoup d'entre elles, ce qui a rendu difficile l'identification sans équivoque des mécanismes de régulation adaptés [206, 279]. Cependant, les progrès accomplis au cours des dernières années sur les méthodes moléculaires, y compris l'analyse des mutants et des plantes transgéniques, ont également fortement contribué à la compréhension de la biosynthèse des phytoalexines et de leur régulation. Ces connaissances, associées aux caractéristiques intrinsèques des phytoalexines, en tant que substances antimicrobiennes à large spectre, en font une cible prometteuse pour l'amélioration des espèces végétales [206, 280, 281]. Compte tenu de l'objectif de réduction de l'utilisation des pesticides et des limites de la sélection classique, la régulation génétique des phytoalexines ou des métabolites secondaires en général est considérée comme un objectif encourageant pour améliorer la protection des cultures [279, 282, 283].

Les études sur les phytoalexines se sont appuyées presque exclusivement sur des expériences contrôlées au laboratoire ou sous serre, ce qui fournit un système très net pour étudier l'induction et la régulation de ces composés. D'un autre côté, les plantes des écosystèmes naturels et agricoles sont exposées à de nombreux stress autres que l'attaque d'un agent pathogène. Bien que plus complexe à mettre en place et à interpréter, il serait très utile de déterminer si une plante, se développant dans des conditions naturelles, produit des phytoalexines comme prévu par des expériences d'infection contrôlée, ou si les stress causés par les pratiques culturales entraînent une production plus ou moins constante de phytoalexines [273].

La complexité du pathosystème *Pisum* spp.-*Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* réside dans la diversité de l'agent pathogène représentée par ses différentes races physiologiques, mais aussi dans l'hétérogénéité des populations de la plante hôte.

Dans notre travail, les nouvelles sources de résistances à la maladie ont été identifiées parmi un ensemble de génotypes de pois provenant de différentes régions du monde, révélant ainsi l'éventuelle richesse de ces pays en ressources génétiques. La catégorisation des comportements des génotypes étudiés vis-à-vis du pathogène, témoigne de la praticabilité des méthodes choisies pour évaluer les niveaux de résistance des différents génotypes de pois face à la fusariose vasculaire. L'étude de comportement des génotypes a été complétée par une quantification moléculaire du pathogène et une caractérisation métabolique, pour mettre en évidence les mécanismes impliqués dans la défense de la plante face à la maladie. Cette caractérisation doit être complétée par une évaluation des comportements de ces mêmes génotypes dans des conditions d'infection naturelle en plein champ, mais encore par une étude plus approfondie du déterminisme génétique qualitatif et/ou quantitatif de la résistance, qui est actuellement possible avec l'évolution des méthodes génotypiques, moléculaires et biochimiques. Avec de tels paramètres descriptifs et spécifiques, additionnés aux apports informatiques des bases et d'analyse de données, il est très envisageable de procéder à des sélections assistées par ces marqueurs, dans un programme de travail intégré.

## CONCLUSION

La fusariose vasculaire du pois, causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (Fop), est souvent sévère et engendre des pertes considérables dans les régions propices au développement de cette trachéomycose, tel le cas des conditions pédoclimatiques algériennes. Devant les situations infectieuses, parfois d'ampleur épidémique, la lutte principale à caractère chimique n'assure pas le contrôle souhaitable. Donc, la sélection de cultivars résistants, aux différentes races du pathogène, semble être parmi les mesures les plus appropriées, notamment avec les orientations actuelles pour une gestion durable des écosystèmes agricoles.

Notre travail, dans sa première étape s'intéresse à la recherche et l'identification de caractères de résistance chez *Pisum* spp. vis-à-vis de la fusariose vasculaire chez deux collections de génotypes de pois. En se basant sur l'expression symptomatologique typique de ce pathosystème, nous avons noté des comportements différentiels chez les génotypes étudiés, par rapport à la souche du pathogène inoculée. Les résultats obtenus, confirmés par les suivis du taux d'infection et de l'évolution de la maladie (VIS et AUDPC), permettent de différencier les réponses des génotypes expérimentés (résistance ou sensibilité). Les taux d'infection et les VIS sont positivement corrélés ( $r=0,906$ ).

En somme, chez la première collection (28 génotypes), il existe 28 sources de résistance vis-à-vis des souches R1, Arg1 et Arg3, et 22 sources de résistance vis-à-vis de la souche R2F42. Le calcul des AUDPC confirme que la souche R2F42 est la plus virulente, devançant la souche R1, suivies par Arg1 et Arg3. Avec la deuxième collection (60 génotypes), envers la souche R1, 49 génotypes sont résistants et 11 génotypes sont partiellement résistants. En interaction avec la souche R2F42, 17 nouvelles sources de résistance ont été déterminées, tandis que 16 génotypes sont partiellement résistants et 27 génotypes sont sensibles.

La quantification de l'ADN fongique, par RT-PCR, dans les tissus végétaux est positivement corrélée ( $r=0,953$ ) avec les taux d'infection. Les génotypes résistants (2370, 3068, 2633a et 952) contiennent moins de 24‰ d'ADN fongique par rapport à l'ADN total extrait. Le génotype partiellement résistant P21 a enregistré une valeur de 57,32‰, tandis que les génotypes sensibles ont des quantités d'ADN variant entre 68,96‰ et 95,32‰. Ces résultats indiquent que les génotypes résistants possèdent des mécanismes leur permettant de réduire la colonisation des tissus et d'inhiber, voir même de bloquer, la progression du pathogène dans les tissus vasculaires.

Le dosage de la pisatine par HPLC a révélé des niveaux différentiels d'accumulation de cette phytoalexine dans les racines des génotypes de *Pisum* spp., après 24h et 48h de leur inoculation avec R2F42 de Fop. Les génotypes résistants (952 et 3068) ont accumulé plus de pisatine par rapport au génotype sensible (3029) et partiellement résistant (2996). Ceci témoigne du rôle majeur de la pisatine dans les réactions de défense contre ce pathogène. 15 jours après l'inoculation, la teneur en pisatine a augmenté chez le génotype résistant 952, mais elle a nettement diminué chez l'autre génotype résistant 3068, ce qui indique que la présence du pathogène peut diminuer la quantité de pisatine synthétisée par la plante.

Sur le plan génotypique, les génotypes résistants de *Pisum* spp. identifiés dans cette étude, sont considérés comme source de résistance et seront intégrés dans les programmes de croisement et d'amélioration. Sur le plan phénotypique, cette évaluation reste tributaire de leurs comportements (surveillance et confirmation) dans les conditions naturelles de plein champ et en interaction avec les différentes pratiques culturales, biologiques et même chimiques.

Afin de favoriser les mécanismes les plus durables, il est avantageux de poursuivre les études des caractérisations moléculaire et métabolique, pour une meilleure détermination des mécanismes responsables et effectifs de la résistance/tolérance à *Fusarium oxysporum* f.sp *pisi* (Fop). Il est aussi nécessaire d'isoler et de caractériser des populations locales de Fop et d'approfondir nos investigations, avec le peu d'informations à l'état actuel, pour mieux différencier la virulence de ce pathogène et se prononcer sur ses races éventuelles. Finalement,

il sera intéressant aussi d'étudier le comportement de ces mêmes génotypes vis-à-vis d'autres maladies et stress abiotiques, pour une exploitation durable et intégrée.

## APPENDICES

### Appendice A

#### Liste des symboles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	Analyse de la variance
ARN	Acide ribonucléique
AUDPC	<i>Area Under the Disease Progress Curve</i>
CTAB	Bromure d'hexadécyltriméthylammonium
cv.	Cultivar
CWDE	Enzyme dégradant la paroi cellulaire ( <i>Cell Wall Degrading Enzyme</i> )
dNTPs	Désoxyribonucléosides triphosphate
EDS	Eau Distillée Stérile
ET	Ethylène
f.sp.	Forme spéciale
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
Fop	<i>Fusarium oxysporum f.sp. pisi</i>
G.	Grossissement
H%	Hygrométrie
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HR	Réaction d'hypersensibilité ( <i>Hypersensitive Response</i> )
IAS-CSIC	<i>Instituto de Agricultura Sostenible - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Córdoba, España)</i>
ICARDA	<i>International Center for Agricultural Research in Dry Areas</i>
JA	Acide jasmonique
kDa	Kilodalton
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
PCR	Amplification en chaîne par polymérase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i> (milieu de culture)
pH	Potentiel hydrogène
PR	<i>Pathogenesis-Related Protein</i>

QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
ROS	Espèce réactive d'oxygène ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
rpm	Rotation par minute
RT-PCR	PCR en temps réel ( <i>Real Time PCR</i> )
SA	Acide salicylique
spp.	Espèces
ssp.	Sous-espèce
T°	Température
TAE	Tris/Acétate/EDTA (EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique)
TI%	Taux d'infection
V/V	Volume par volume
var.	Variété
VIS	<i>Visual Index of Severity</i>

## Appendice B

### Milieus de culture et tampons utilisés

#### **Milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*)**

Pomme de terre	200 g
Dextrose	20 g
Agar	15 g
Eau distillée stérile	1 000 ml

Le milieu est par la suite autoclavé pendant 20 min à 120° C.

#### **Milieu PDB (*Potato Dextrose Broth*)**

Pomme de terre	200 g
Dextrose	20 g
Eau distillée stérile	1 000 ml

Le milieu est par la suite autoclavé pendant 20 min à 120° C.

#### **Tampon d'extraction de l'ADN (CTAB)**

Ajouter 1,21 g de Tris Base dans 50 ml d'eau distillée stérile.

Ajuster le pH à 8,0 avec du NaOH.

Ajouter 0,744 g EDTA, 8,18 g NaCl et 2 g CTAB.

Réchauffer à 60°C jusqu'à dissolution.

Ajuster le pH à 8,0 avec du NaOH.

Compléter à 100 ml et conserver à 37°C.

#### **Gel d'agarose pour l'électrophorèse**

Tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA)	100 ml
agarose	0,7 g
GelGreen	4 µl

## Appendice C

Pays d'origine des 28 géotypes de pois de la première collection

<b>Géotypes</b>	<b>Espèce correspondante</b>	<b>Pays d'origine</b>
<b>JI 1412</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	Inconnu
<b>JI 1760</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	Inconnu
<b>JI 1559</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	Inconnu
<b>JI 2480</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	Inconnu
<b>Radley</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	Inconnu
<b>Polar</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	Inconnu
<b>Messire</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	Inconnu
<b>74SN5</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	Inconnu
<b>New Season</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	Inconnu
<b>1123</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	Inde
<b>2946</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	Inde
<b>M. Kelvedon</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	Inconnu
<b>P42</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>arvense</i>	Afghanistan
<b>P627</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>arvense</i>	Ethiopie
<b>P632</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>arvense</i>	Ethiopie
<b>P633</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>arvense</i>	Ethiopie
<b>P634</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>arvense</i>	Ethiopie
<b>P638</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>arvense</i>	Ethiopie
<b>Séfrou</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>arvense</i>	Maroc
<b>P21</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>elatius</i>	Soudan
<b>P614</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>elatius</i>	Turquie
<b>P615</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>elatius</i>	Turquie
<b>P650</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>jormadi</i>	Ethiopie
<b>P665</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>syriacum</i>	Syrie
<b>P316</b>	<i>P. fulvum</i>	Inconnu
<b>P656</b>	<i>P. fulvum</i>	Syrie
<b>P651</b>	<i>P. fulvum</i>	Syrie
<b>P669</b>	<i>P. fulvum</i>	Turquie

## Appendice D

Espèces correspondantes et pays d'origine des 60 géotypes de pois de la deuxième collection

Géotype	Espèce correspondante	Origine	Type de matériel
<b>1. 1148</b>	<i>P. sativum</i>	Inde	Variété locale
<b>2. 1149</b>	<i>P. sativum</i>	Inde	Variété locale
<b>3. 1160</b>	<i>P. sativum</i>	Inde	Variété locale
<b>4. 1171</b>	<i>P. sativum</i>	Inde	Variété locale
<b>5. 1176</b>	<i>P. sativum</i>	Inde	Variété locale
<b>6. 1196</b>	<i>P. sativum</i>	Inde	Variété locale
<b>7. 2905</b>	<i>P. sativum</i>	Inde	Variété locale
<b>8. 2938</b>	<i>P. sativum</i>	Inde	Variété locale
<b>9. 2946</b>	<i>P. sativum</i>	Inde	Variété locale
<b>10. 944</b>	<i>P. sativum</i>	Hongrie	Variété locale
<b>11. 952</b>	<i>P. sativum</i>	Hongrie	Variété locale
<b>12. 1994</b>	<i>P. sativum</i>	Grèce	Sauvage
<b>13. 1996</b>	<i>P. sativum</i>	Grèce	Sauvage
<b>14. 1066</b>	<i>P. sativum</i>	Turquie	Variété locale
<b>15. 2448</b>	<i>P. sativum</i>	Turquie	Variété locale
<b>16. 2329</b>	<i>P. sativum</i>	Ethiopie	Variété locale
<b>17. 2575</b>	<i>P. sativum</i>	Ethiopie	Variété locale
<b>18. 2633a</b>	<i>P. sativum</i>	France	Inconnu
<b>19. 2633b</b>	<i>P. sativum</i>	France	Inconnu
<b>20. 3044</b>	<i>P. sativum</i>	R. Tchèque	Lignée améliorée
<b>21. 3068</b>	<i>P. sativum</i>	R. Tchèque	Lignée améliorée
<b>22. 3029</b>	<i>P. sativum</i>	Australie	Lignée améliorée
<b>23. 3030</b>	<i>P. sativum</i>	Australie	Lignée améliorée
<b>24. 3034</b>	<i>P. sativum</i>	Australie	Lignée améliorée
<b>25. 2372</b>	<i>P. sativum</i>	Pakistan	Variété locale
<b>26. 2995</b>	<i>P. sativum</i>	Pakistan	Variété locale
<b>27. 2996</b>	<i>P. sativum</i>	Pakistan	Variété locale
<b>28. 2998</b>	<i>P. sativum</i>	Pakistan	Variété locale
<b>29. 22</b>	<i>P. sativum</i>	Pérou	Cultivar (ALBERJON)
<b>30. 26</b>	<i>P. sativum</i>	Iran	Variété locale

<b>Génotype</b>	<b>Espèce correspondante</b>	<b>Origine</b>	<b>Type de matériel</b>
<b>31. 27</b>	<i>P. sativum</i>	Equateur	Variété locale
<b>32. 223</b>	<i>P. sativum</i>	Finlande	Variété locale
<b>33. 742</b>	<i>P. sativum</i>	Suède	Variété locale
<b>34. 801</b>	<i>P. sativum</i>	Allemagne	Variété locale
<b>35. 904</b>	<i>P. sativum</i>	Pologne	Variété locale
<b>36. 1046</b>	<i>P. sativum</i>	Etats-Unis	Variété locale
<b>37. 1556</b>	<i>P. sativum</i>	Kenya	Cultivar (ONWARD)
<b>38. 2017</b>	<i>P. sativum</i>	Colombie	Variété locale
<b>39. 2605</b>	<i>P. sativum</i>	Danemark	Cultivar (ROSAKRONE)
<b>40. 2714</b>	<i>P. sativum</i>	Bulgarie	Variété locale
<b>41. 3106</b>	<i>P. sativum</i>	Espagne	-
<b>42. 760</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	Royaume-Uni	Variété locale
<b>43. 2310</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	Espagne	Variété locale
<b>44. P65</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	Espagne	Sauvage
<b>45. P39</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	Chypre	Inconnu
<b>46. P315</b>	<i>P. sativum</i> var. <i>arvense</i>	-	Sauvage
<b>47. P629</b>	<i>P. sativum</i> var. <i>arvense</i>	Ethiopie	Inconnu
<b>48. P630</b>	<i>P. sativum</i> var. <i>arvense</i>	Ethiopie	Inconnu
<b>49. P633</b>	<i>P. sativum</i> var. <i>arvense</i>	Ethiopie	Inconnu
<b>50. P648</b>	<i>P. sativum</i> var. <i>arvense</i>	Ethiopie	Inconnu
<b>51. P26</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>elatius</i>	Grèce	Sauvage
<b>52. P69</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>elatius</i>	Turquie	Inconnu
<b>53. P691</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>elatius</i>	Turquie	Inconnu
<b>54. P692</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>elatius</i>	Turquie	Inconnu
<b>55. 2367</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>cinereum</i>	Russie	Sauvage
<b>56. 2370</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>cinereum</i>	Russie	Sauvage
<b>57. 2378</b>	<i>P. sativum</i> ssp. <i>cinereum</i>	Russie	Sauvage
<b>58. 2076</b>	<i>P. abyssinicum</i>	Yémen	Variété locale
<b>59. 2342</b>	<i>P. abyssinicum</i>	Egypte	Sauvage
<b>60. 1943</b>	<i>P. fulvum</i>	Palestine	Sauvage

## Appendice E

ANOVA appliquée aux taux d'infection, aux VIS et aux AUDPC des 28 géotypes du pois en interaction avec les quatre souches pathogènes de Fop

### Taux d'infection

Facteur	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ratio	Valeur p
<b>Géotype</b>	56 571,512	27	2 095,241	13,243	0,000***
<b>Souche</b>	45 625,682	3	15 208,561	96,126	0,000***
<b>Géotype*Souche</b>	37 161,549	81	458,785	2,900	0,000***

(\*\*\*) : Différences très hautement significatives.

### VIS

Facteur	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ratio	Valeur p
<b>Géotype</b>	111,233	27	4,120	12,870	0,000***
<b>Souche</b>	113,857	3	37,952	118,565	0,000***
<b>Géotype*Souche</b>	105,582	81	1,303	4,072	0,000***

(\*\*\*) : Différences très hautement significatives.

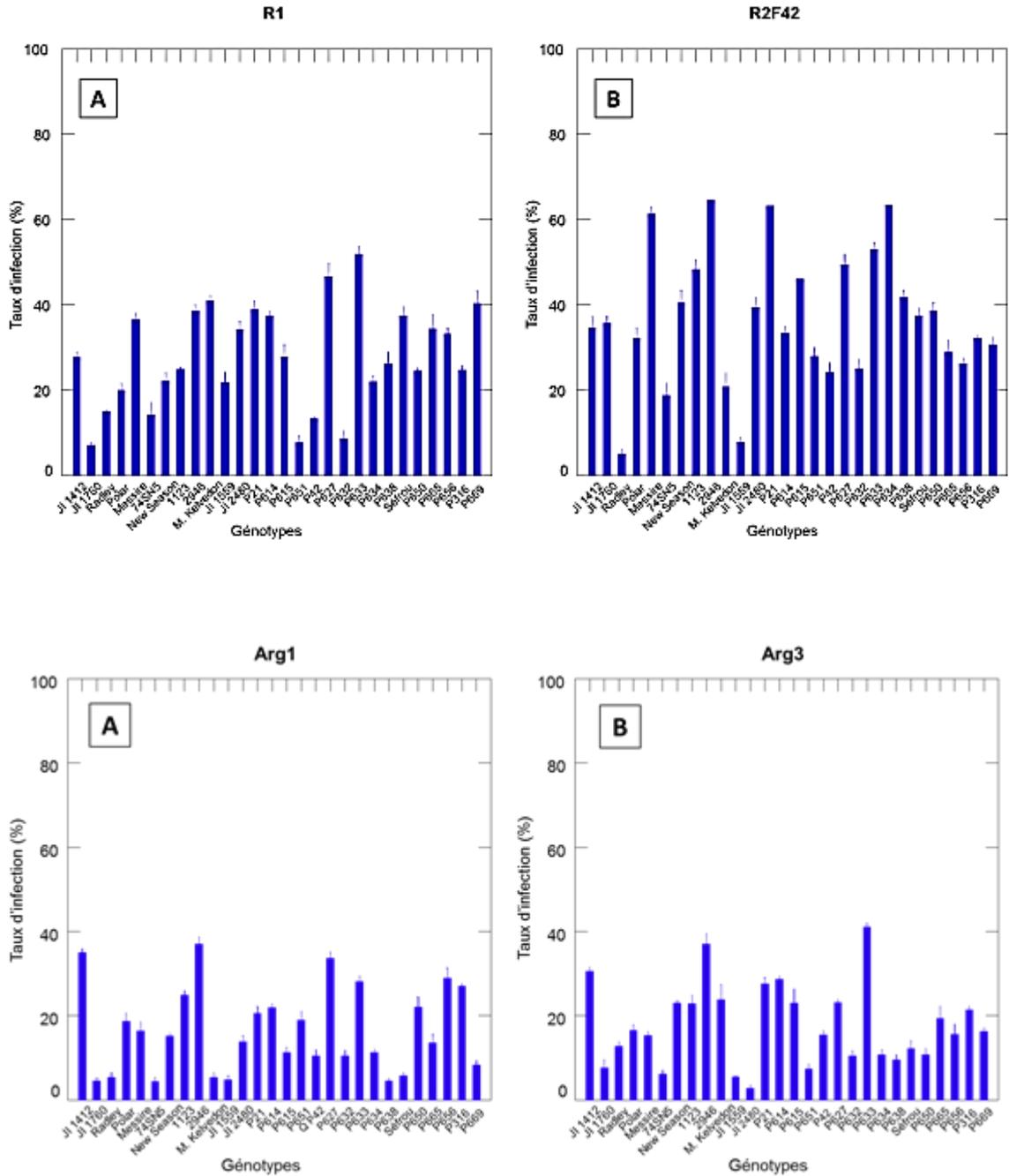
### AUDPC

Facteur	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ratio	Valeur p
<b>Géotype</b>	15 445 054,790	27	572 039,066	16,722	0,000***
<b>Souche</b>	8 334 904,629	3	2 778 301,543	81,216	0,000***
<b>Géotype*Souche</b>	6 306 758,153	81	77 861,212	2,276	0,000***

(\*\*\*) : Différences très hautement significatives.

### Appendice F

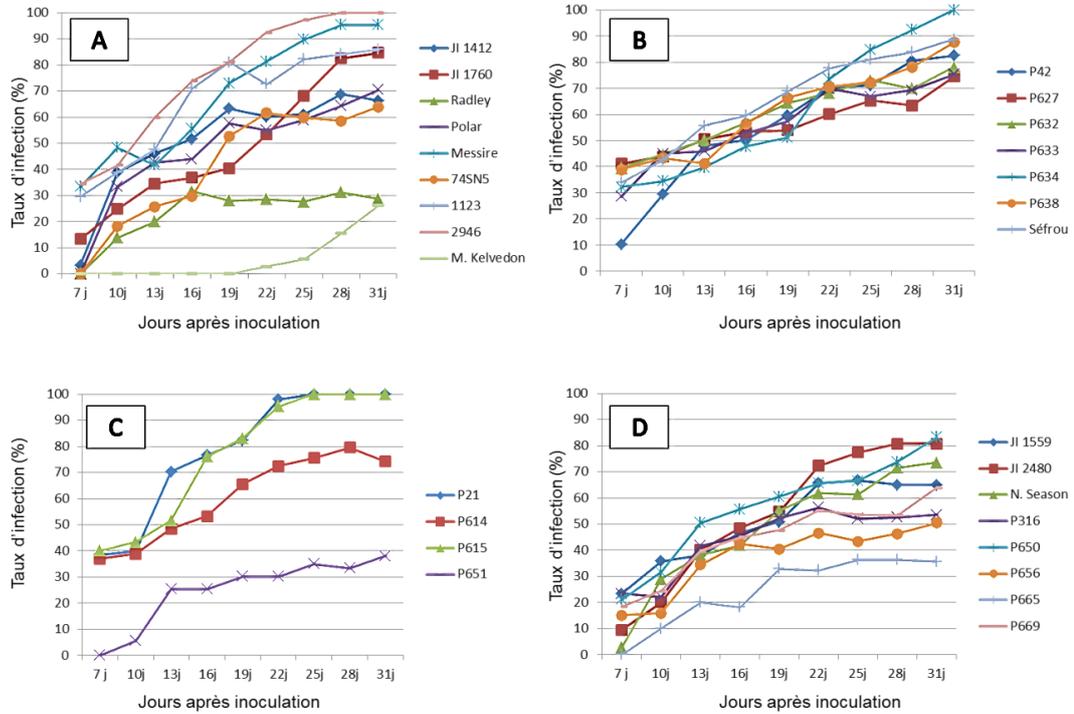
Taux d'infection des 28 géotypes de pois, 31 jours après leur inoculation avec les quatre souches de Fop



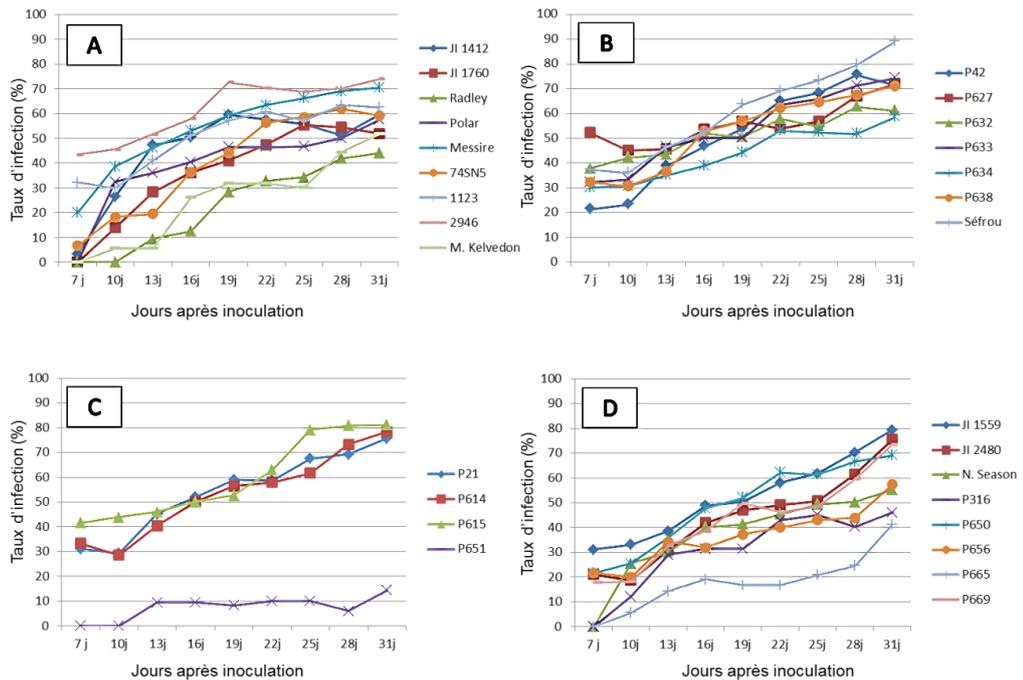
## Appendice I

### Evolution des taux d'infection des 28 géotypes de pois

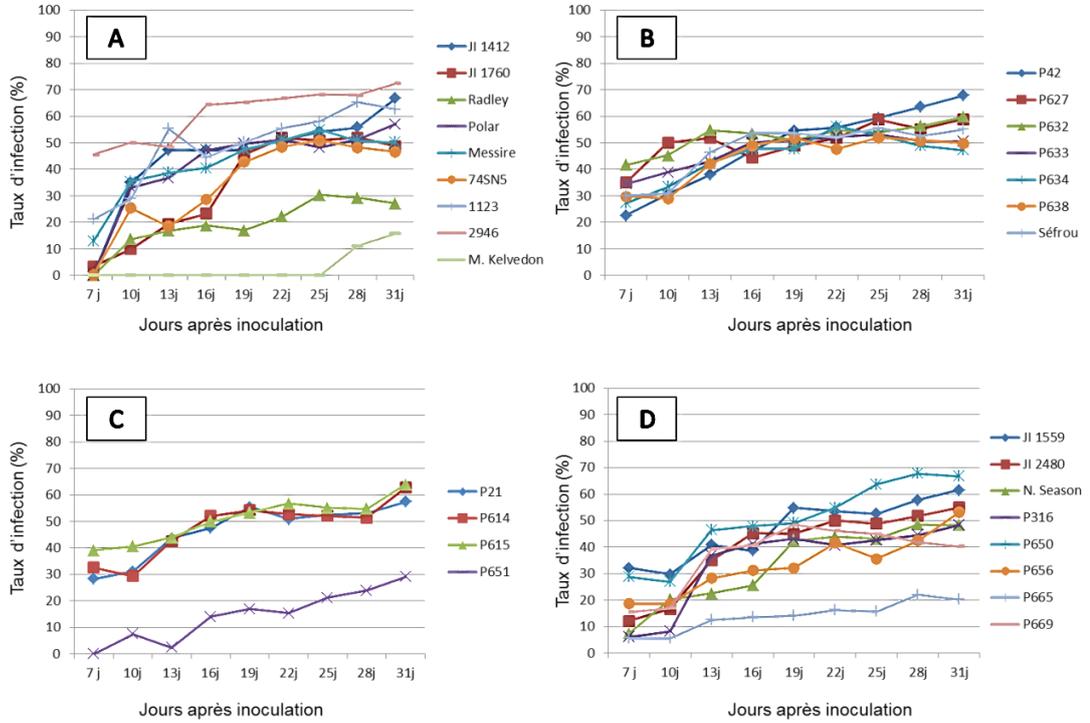
#### Souche R2F42 de Fop



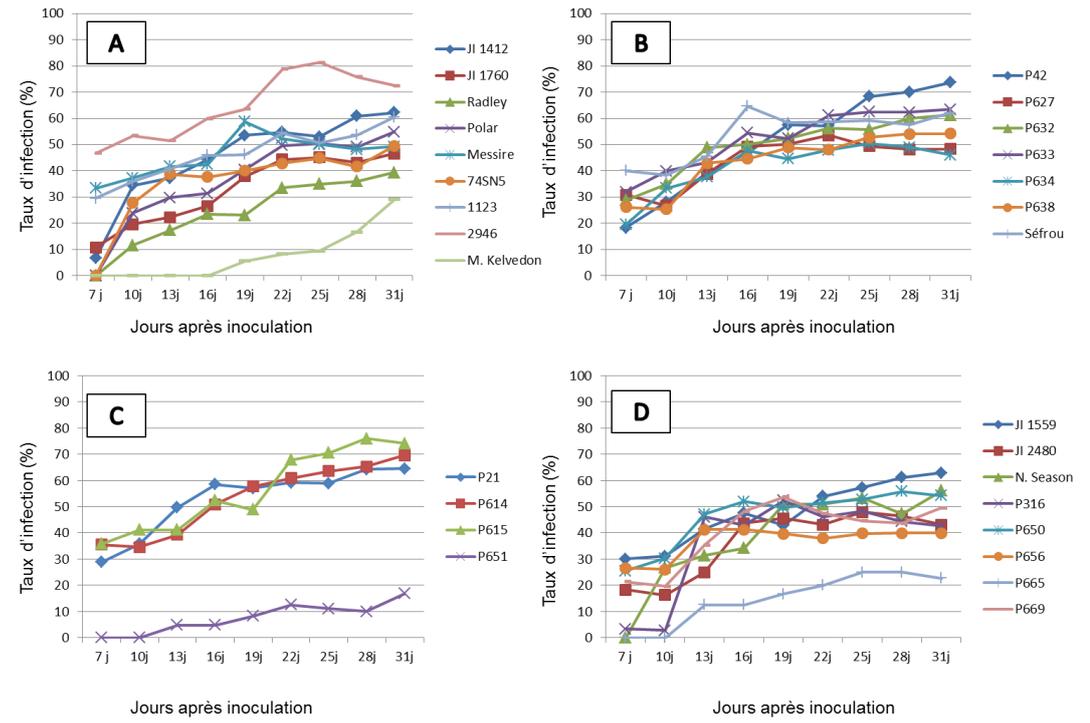
#### Souche R1 de Fop



### Souche Arg1 de Fop



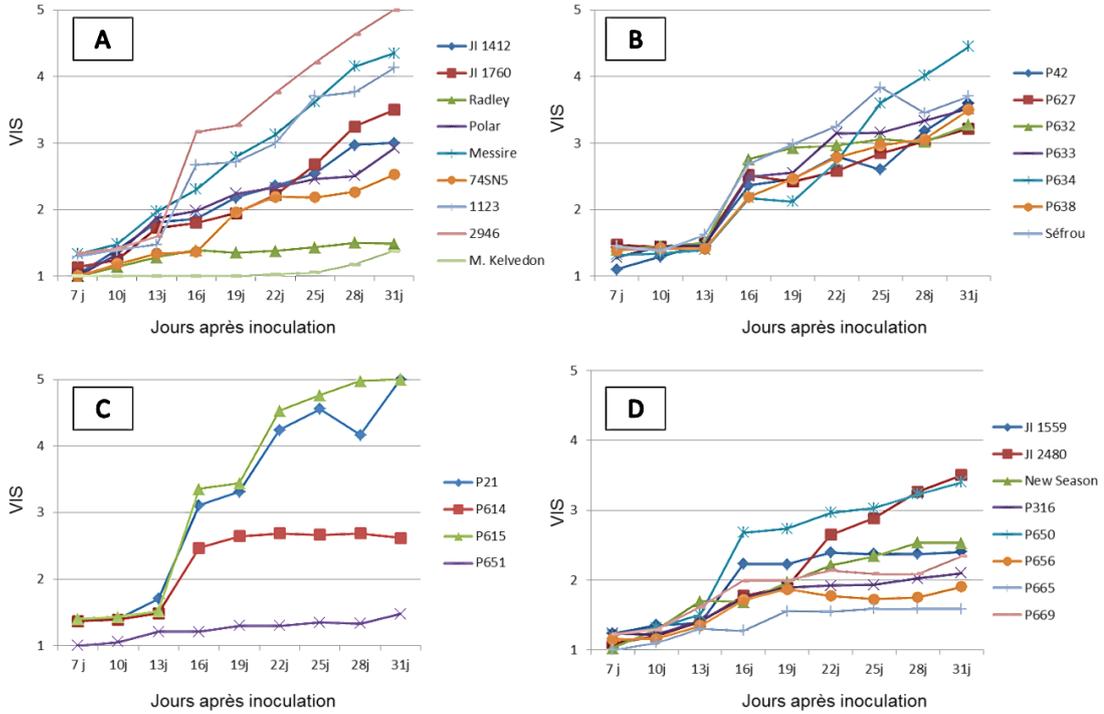
### Souche Arg3 de Fop



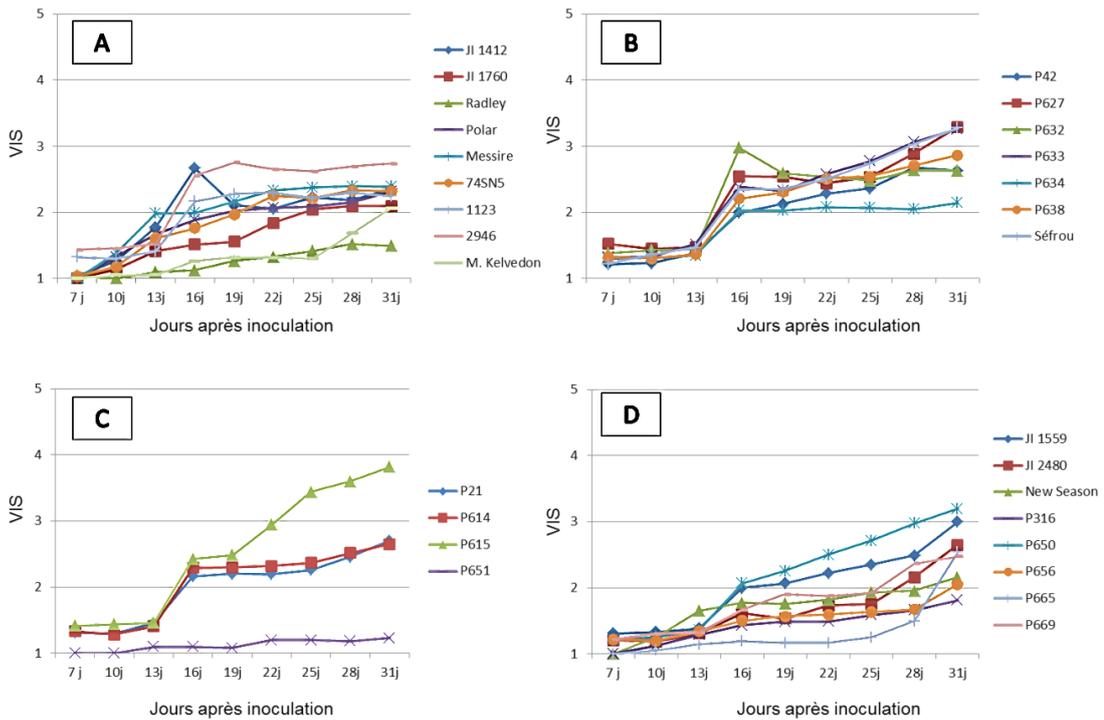
## Appendice J

### Evolution des valeurs VIS des 28 génotypes de pois

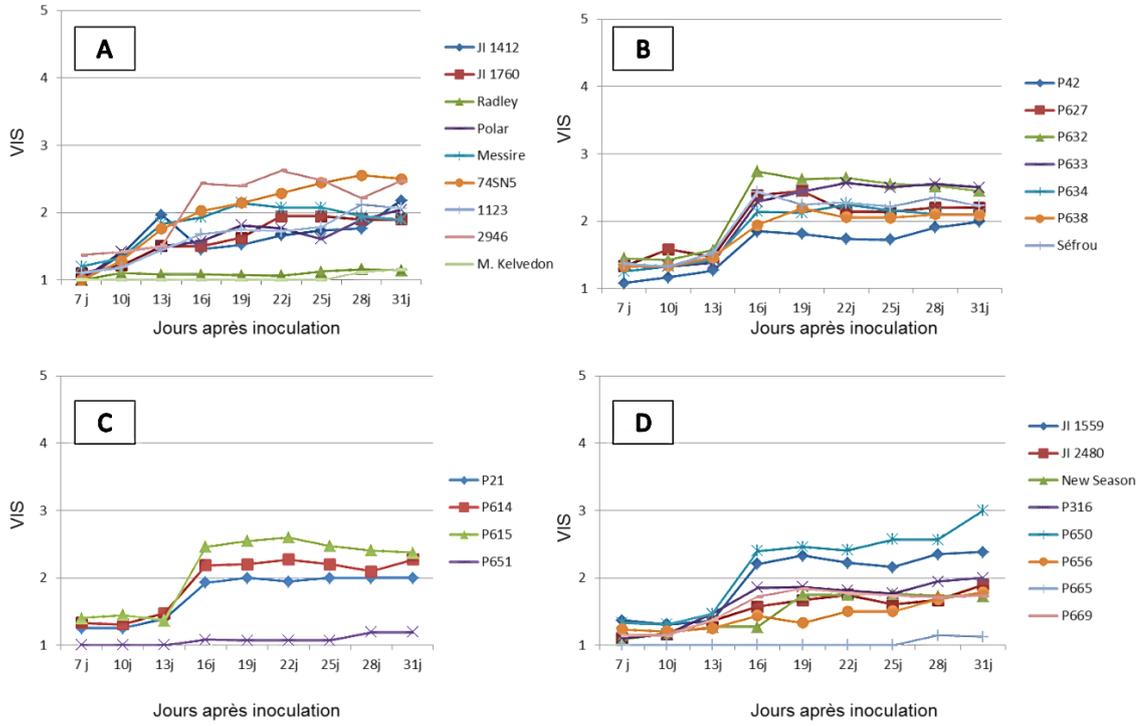
#### Souche R2F42 de Fop



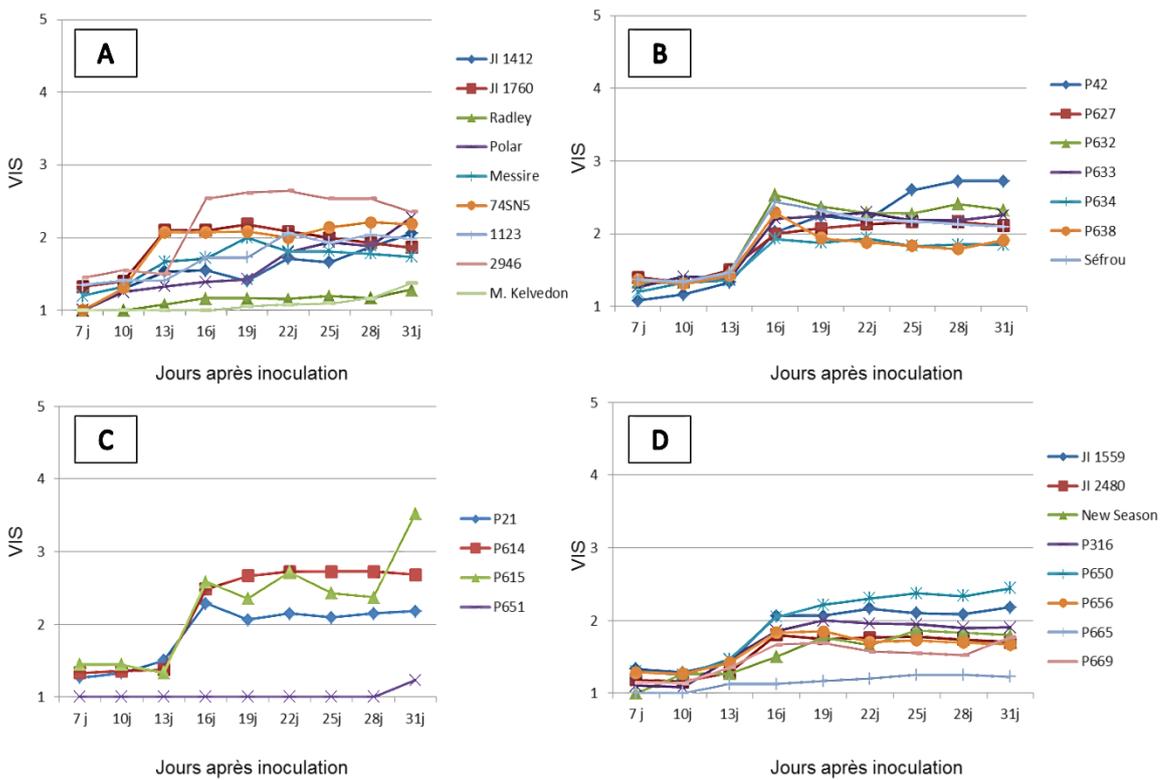
#### Souche R1 de Fop



### Souche Arg1 de Fop



### Souche Arg3 de Fop



## Appendice K

ANOVA appliquée aux taux d'infection, aux VIS et aux AUDPC des 60 géotypes du pois en interaction avec les deux souches pathogènes de Fop

### Taux d'infection

Facteur	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ratio	Valeur p
<b>Géotype</b>	120 828,852	59	2 047,947	9,110	0,000***
<b>Souche</b>	104 332,567	1	104 332,567	464,131	0,000***
<b>Géotype*Souche</b>	95 140,934	59	1 612,558	7,174	0,000***

(\*\*\*) : Différences très hautement significatives.

### AUDPC

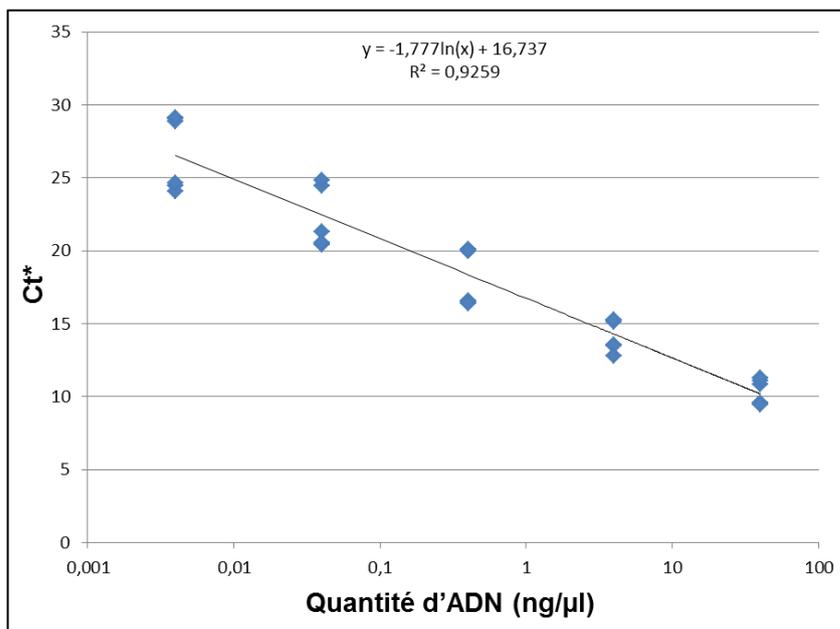
Facteur	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ratio	Valeur p
<b>Géotype</b>	1,198E+008	59	2 030 941,074	25,102	0,000***
<b>Souche</b>	42 255 824,331	1	42 255 824,331	522,266	0,000***
<b>Géotype*Souche</b>	57 230 448,274	59	970 007,598	11,989	0,000***

(\*\*\*) : Différences très hautement significatives.

## Appendice L

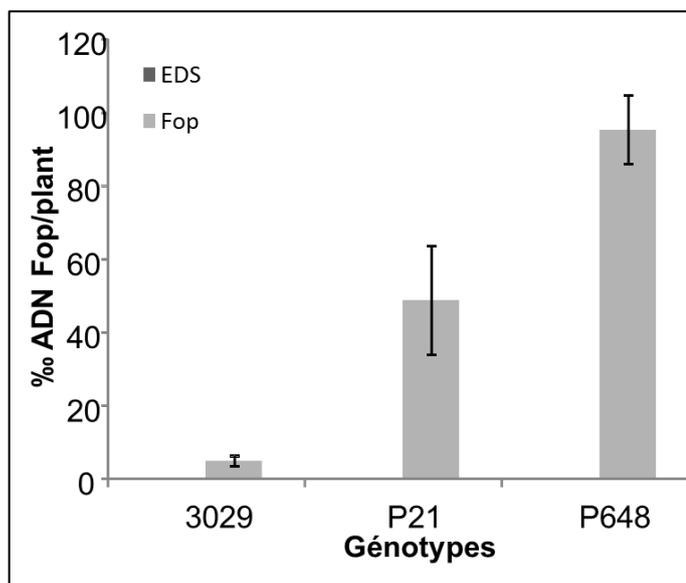
Quantification moléculaire de Fop *in planta* par RT-PCR

### Courbe standard pour la RT-PCR



(\*) Ct : Nombre de cycle nécessaire pour que le signal fluorescent soit détectable.

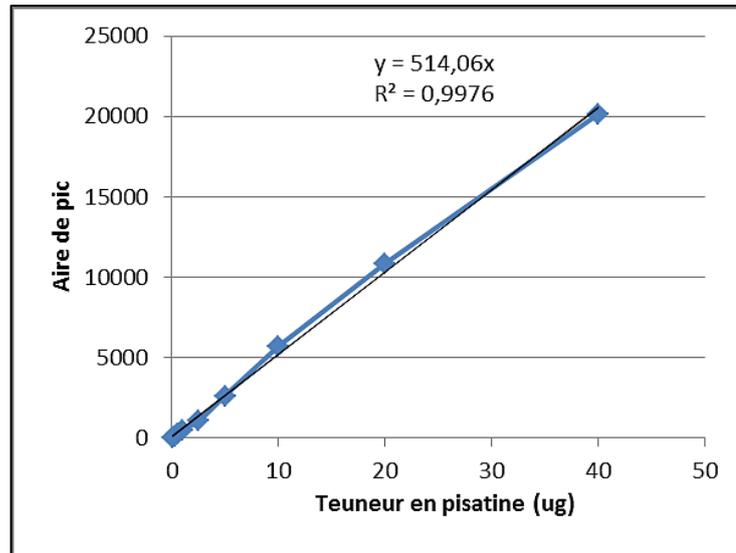
### Comparaison des taux d'ADN fongique (Fop) enregistrés par les géotypes inoculés rapportés aux témoins (EDS)



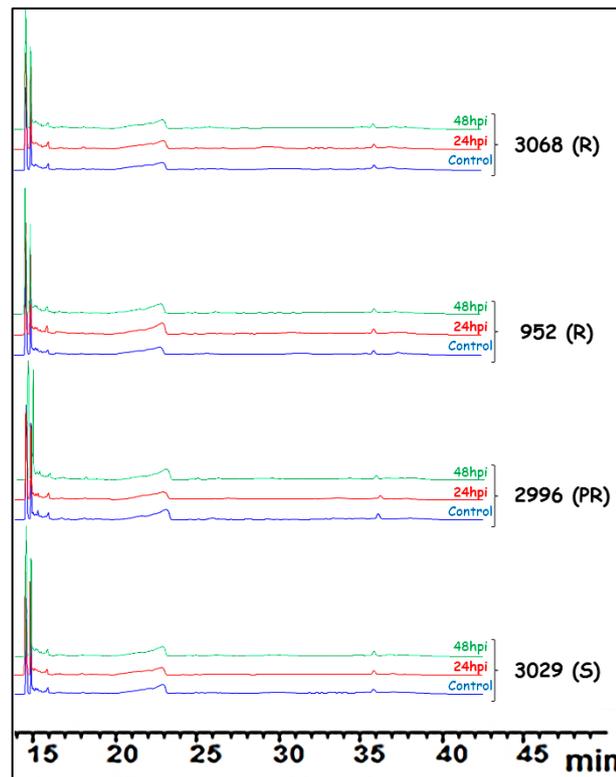
## Appendice M

Dosage de la pisatine par HPLC

### Courbe d'étalonnage du dosage de la pisatine



### Chromatogrammes du dosage de la pisatine



## Appendice N

ANOVA appliquée aux teneurs en pisatine

### Exprimées en aire/mg de racine

Source de variation	ddl	Somme des carrés	Carrés moyens	F-ratio	Valeur p
<b>Génotype</b>	3	27.4489	9.1496	15.44	<.001
<b>Traitement</b>	2	5.5473	2.7737	4.68	0.019
<b>Génotype*Traitement</b>	6	5.9455	0.9909	1.67	0.171
<b>Résiduel</b>	24	14.2264			
<b>Total</b>	35	53.1682			

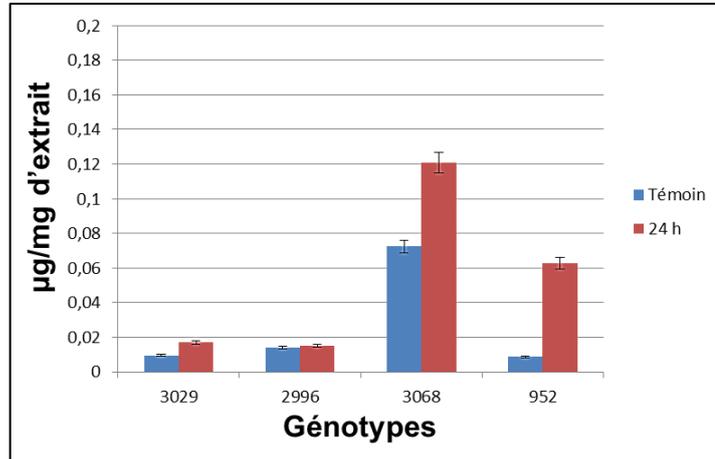
### Exprimées en aire/mg d'extrait

Source de variation	ddl	Somme des carrés	Carrés moyens	F-ratio	Valeur p
<b>Génotype</b>	3	17.6352	5.8784	11.22	<.001
<b>Traitement</b>	2	6.8091	3.4046	6.50	0.006
<b>Génotype*Traitement</b>	6	5.9914	0.9986	1.91	0.121
<b>Résiduel</b>	24	12.5747	0.5239		
<b>Total</b>	35	43.0104			

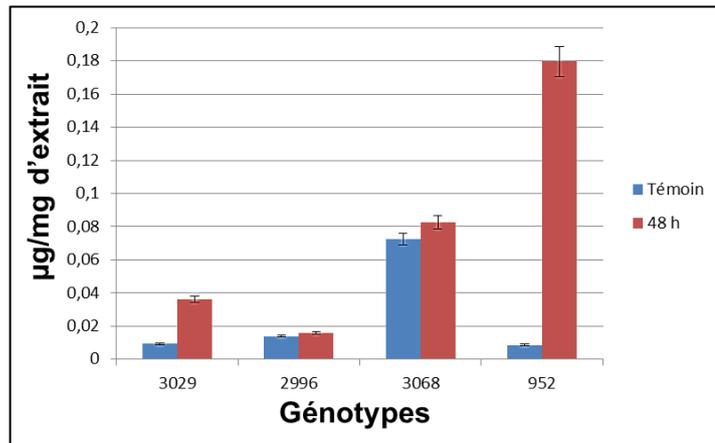
## Appendice O

Résultats du dosage de la pisatine exprimés en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait

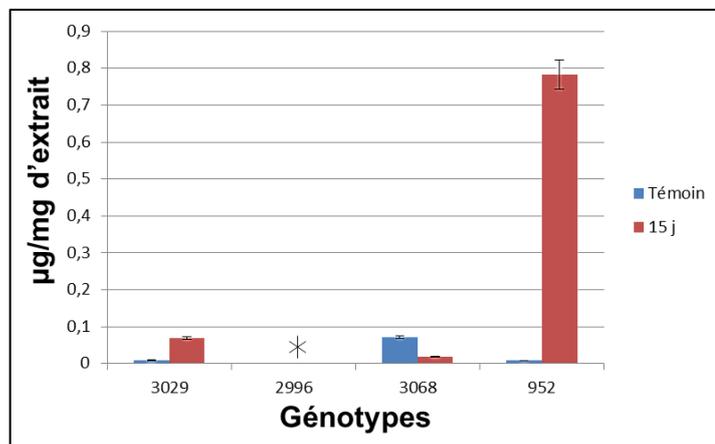
### Après 24h de l'inoculation



### Après 48h de l'inoculation



### Après 15 jours de l'inoculation



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Jin, X., Yang, Y., Jiao, F., Zhou, Y., Gao, Y., Wang, D., Xu, C. and Zhai, R., “Effect of nitrogen supply on rhizobacterial propagation and soil enzyme activity in pot soil cultivated with *Phytophthora infestans* -infected potato plants”, J. Adv. Res., 9, (2015), 469-476.
2. Benoît, M., Deffontaines, J.P. et Lardon S., « Acteurs et territoires locaux. Vers une géoagronomie de l'aménagement », Collection Savoir-Faire, INRA, (2006).
3. Brink, M. et Belay, G., « Ressources végétales de l'Afrique tropicale 1. Céréales et légumes secs ». Fondation PROTA, Pays-Bas, (2006), 171-177.
4. Malaguti, M., Dinelli, G., Leoncini, E., Bregola, V., Bosi, S., Cicero, A.F. and Hrelia, S., “Bioactive peptides in cereals and legumes: agronomical, biochemical and clinical aspects”, International Journal of Molecular Sciences, 15 (11), (2014), 21120-21135.
5. FAOSTAT, <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/>, (2020).
6. Zohary, D. and Hopf, M., “Domestication of plants in the Old World: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley”, Oxford Univ. Press., Oxford, U.K., (2000), 316 p.
7. Weiss, E. and Zohary, D., “The Neolithic southwest Asian founder crops”, Curr. Anthropol., 52, (2011), S237-S254.
8. Smýkal, P., e Coyne, C., Redden, R. and Maxted, N., “Peas”, In: Genetic and Genomic Resources of Grain Legume Improvement, Elsevier, (2013), 41-80.
9. Rubiales, D., Ambrose, M.J., Domoney, C. and Burstin, J., “Pea (*Pisum sativum* L.)” .In: Perez de la Vega, M., Cubero, J.I., Torres, A.M. (eds) Genetics, genomics and breeding of cool season grain legumes. CRC Press, Boca Raton FL y Science Publishers, Enfield, NH, (2012), 1-49.
10. Smýkal, P., Aubert, G., Burstin, J., Coyne, C.J., Ellis, N.T.H., Flavell, A.J., Ford, R.R., Hýbl, M., Macas, J., Neumann, P., McPhee, K.E., Redden, R.J., Rubiales, D., Weller, J.L. and Warkentin, T.D., “Pea (*Pisum sativum* L.)”, In The genomic era, Agronomy, 2, (2012), 74-115.

11. Kraft, JM. and Pflieger, F.L., "Compendium of Pea Diseases", APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, (2001), 67 p.
12. Aslam, S., Ghazanfar, M.U., Munir, N. and Hamid, M.I., "Managing fusarium wilt of pea by utilizing different application methods of fungicides", Pak. J. Phytopathol., 31 (1), (2019), 81-88.
13. Kraft J.M., "Fusarium wilt of peas (a review)". Agronomie, 14, (1994), 561-567.
14. Infantino, A., Kharrat, M., Riccioni, L., Coyne, C.J., McPhee, K.E. and Grunwald, N.J., "Screening Techniques and Sources of Resistance to Root Diseases in Cool Season Food Legumes", Euphytica, 147, (2006), 201-221.
15. Merzoug, A, Belabid, L., Youcef-Benkada, M. Benfreha, F. and Bayaa, B., "Pea Fusarium Wilt Races in Western Algeria", Plant Protect. Sci., 50 (2), (2014), 70-77.
16. Navas-Cortes, J.A., Hau, B. and Jimenez-Diaz, R.M., "Effect of sowing date, host cultivar, and race of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* on development of fusarium wilt of chickpea", Phytopathology, 88, (1998), 1338-1346.
17. Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q. and Steinberg, C., "Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*", The New Phytologist, 184, (2009), 529-544.
18. Momma, N., Momma, M. and Kobara, Y., "Biological soil disinfestation using ethanol: effect on *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and soil microorganisms", Journal of General Plant Pathology, 76, (2010), 336-344.
19. Sharma, A., Rathour, R., Plaha, P., Katoch, V., Khalsa, G.S., Patial, V., Singh, Y. and Pathania, N.K., "Induction of fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*) resistance in garden pea using induced mutagenesis and *in vitro* selection techniques", Euphytica, 173, (2010), 345-356.
20. Bani M., Rubiales, D. and Risipail, N., "A detailed evaluation method to identify sources of quantitative resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* race 2 within a *Pisum* spp. germplasm collection", Plant Pathology, 61, (2012), 532-542.
21. Lebeda, A., Švábová, L. and Dostálová, R., "Screening of peas for resistance to fusarium wilt and root rot (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*)", Mass Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Diseases FAO/IAEA, Vienna, (2010), 189-196.

22. Rubiales, D., Fondevilla, S., Chen, W., Gentzbittel, L., Higgins, T.J.V., Castillejo, M.A., Singh, K.B. and Rispaïl, N., "Achievements and challenges in legume breeding for pest and disease resistance", *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, (2015), 195-236.
23. Mekhaldi, D., « Etude du pathosystème *Pisum sativum*-*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* », Mémoire de magister en phytopathologie, Univ. Blida 1, (2016), 102 p.
24. Yala, A., « Essai de biocontrôle de la fusariose vasculaire du petit pois », Mémoire de magister en phytopathologie, Univ. Blida 1, (2016), 122 p.
25. Bachir, A., « Essais de comportement de génotypes améliorés de *Pisum sativum* L. vis-a-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* », Mémoire de magister en phytopathologie, Univ. Blida 1, (2016), 106 p.
26. Gepts, P., Beavis, W.D., Brummer, E.C., Shoemaker, R.C., Stalker, H.T., Weeden, N. F. and Young, N. D., "Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference", *Plant Physiology*, 137(4), (2005), 1228-1235.
27. Messina, M.J., "Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects", *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70 (3, Suppl.), (1999), 439S-450S.
28. Rio, C., « Les légumes secs, aliments de choix à valoriser », *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 52 (2), (2017), 71-77.
29. Çakir, O., Uçarlı, C., Tarhan, C., Pekmez, M. and Turgut-Kara, N., "Nutritional and health benefits of legumes and their distinctive genomic properties", *Food Sci. Technol.*, 39 (1), (2019), 1-12.
30. Kouris-Blazos, A. and Belski, R., "Health benefits of legumes and pulses with a focus on Australian sweet lupins", *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 25 (1), (2016), 1-17.
31. Preece, C. and Peñuelas, J., "Rhizodeposition under drought and consequences for soil communities and ecosystem resilience", *Plant Soil*, 409, (2016), 1-17.
32. Gogoi, N., Baruah, K.K. and Meena, R.S., "Grain legumes: impact on soil health and agroecosystem", *In: Meena, R.S. et al. (eds.), Legumes for Soils Health and Sustainable Management*, Springer Nature Singapore, (2018), 511-539.

33. Bussmann, R.W., Batsatsashvili, K., Kikvidze, Z., Paniagua-Zambrana, N.Y., Khutsishvili, M., Maisaia, I., Sikharulidze, S. and Tchelidze, D., "*Pisum sativum* L. FABACEAE", *In*: K. Batsatsashvili *et al.* (eds.), *Ethnobotany of the Mountain Regions of Far Eastern Europe*, Springer Nature Switzerland, (2020), 1465-1468.
34. Hort, A.F., "Theophrastus: Enquiry into Plants", Loeb Classical Library 70, Cambridge, MA, Harvard University Press, I (1-5), (1916).
35. Fourmont, R., « Les variétés de pois (*Pisum sativum*) cultivées en France », INRA, Paris, (1956), 253 p + 70 planches.
36. Maxted, N. and Ambrose, M., "Peas (*Pisum* L.)", Chapter 10 *In*: *Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean* Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, (2001), 181-190.
37. Jing, R., Vershinin, A., Grzebota, J., Shaw, P., Smýkal, P., Marshall, D., Ambrose, M.J., Ellis, T.H.N. and Flavell, A.J., "The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis", *BMC Evol. Biol.*, 10, (2010), 44.
38. Ellis, T.H.N., "*Pisum* L." Chapter 12, *In*: Kole C.Kole C. (Ed.), *Wild Crop Relatives, Genomic and Breeding Resources* Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, (2011), 237-248.
39. Zaytseva, O.O., Gunbin, K.V., Mglinets, A.V. and Kosterin, O.E., "Divergence and population traits in evolution of the genus *Pisum* L. as reconstructed using genes of two histone H1 subtypes showing different phylogenetic resolution", *Gene*, 556, (2015), 235-244.
40. Weeden, N., "Domestication of pea (*Pisum sativum* L.): the case of the Abyssinian Pea", *Front. Plant Sci.*, 9, (2018), 515.
41. Zaytseva, O.O., Bogdanova, V.S., Mglinets, A.V. and Kosterin, O.E., "Refinement of the collection of wild peas (*Pisum* L.) and search for the area of pea domestication with a deletion in the plastidic psbA-trnH spacer", *Genet. Resour. Crop Evol.*, 64 (6), (2017), 1417-1430.
42. Cousin, R., "Peas (*Pisum sativum* L.)", *Field Crops Research*, 53, (1997), 111-130.

43. Thomé, O.W., "Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz", Gera-Untermhaus, Bearbeitung durch Stüber, K. im 1999. [www.BioLib.de](http://www.BioLib.de), 1-3, (1885), p 486.
44. Bueckert, R.A., Wagenhoffer, S., Hnatowich, G. and Warkentin, T.D., "Effect of heat and precipitation on pea yield and reproductive performance in the field", *Can. J. Plant Sci.*, 95, (2015), 629-639.
45. Cieslarová, J., Smýkal, P., Dockalová, Z., Hanáček, P., Prochazka, S., Hýbl, M. and Griga, M., "Molecular evidence of genetic diversity changes in pea (*Pisum sativum* L.) germplasm after long-term maintenance", *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58, (2011), 439-451.
46. Dixon, R.A. and Sumner, L.W., "Legume natural products: Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health", *Plant Physiology*, 131 (3), (2003), 878-885.
47. Arnoldi, A., Boschin, G., Zanoni, C. and Lammi, C., "The health benefits of sweet lupin seed flours and isolated proteins", *Journal of Functional Foods*, 18, (2015), 550-563.
48. Möller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N. and Schrezenmeir, J., "Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects", *European Journal of Nutrition*, 47 (4), (2008), 171-182.
49. Mejia, E.G. and Dia, V.P., "The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells", *Cancer and Metastasis Reviews*, 29 (3), (2010), 511-528.
50. Li, J.T., Zhang, J.L., He, H., Ma, Z.L., Nie, Z.K., Wang, Z.Z. and Xu, X.G., "Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by corn peptides and its anti-tumor efficacy in H22 tumor bearing mice", *Food and Chemical Toxicology*, 51, (2013), 297-305.
51. Zambrowicz, A., Timmer, M., Polanowski, A., Lubec, G. and Trziszka, T., "Manufacturing of peptides exhibiting biological activity", *Amino Acids*, 44 (2), (2013), 315-320.
52. Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A. and Villanueva-Suárez, M., "Isolation and characterization of cell wall polysaccharides from legume by-products: Okara (soymilk residue), pea pod and broad bean pod", *Food Chemistry*, 122 (1), (2010), 339-345.

53. Mary, S.G., Sugumaran, P., Niveditha, S., Ramalakshmi, B., Ravichandran, P. and Seshadri, S., "Production, characterization and evaluation of biochar from pod (*Pisum sativum*), leaf (*Brassica oleracea*) and peel (*Citrus sinensis*) wastes", *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 5, (2013), 43-53.
54. Vojvodić, A., Komes, D., Vovk, I., Belščak-Cvitanović, A. and Bušić, A., "Compositional evaluation of selected agro-industrial wastes as valuable sources for the recovery of complex carbohydrates", *Food Research International*, 89, (2016), 565-573.
55. Mejri, F., Ben Khoud, H., Njim, L., Baati, T., Selmi, S., Martins, A., Serralheiro, M.L.M., Rauter, A.P. and Hosni, K., "*In vitro* and *in vivo* biological properties of pea pods (*Pisum sativum* L.)", *Food Bioscience*, 32, (2019), 100482.
56. Laumont, P. and Chevassus, A., "A note on the improvement of the round pea in Algeria", *Ann. Ec. Agric. Alger.*, 2 (1), (1960), 23 p.
57. Abdelguerfi, A., « Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture », *Rapport de Synthèse sur la Biodiversité Importante pour l'Agriculture en Algérie*, MATE-GEF/PNUD, Proj., ALG/97/G31, Tome IX, (2003), 122 p.
58. Institut national de recherche agronomique d'Algérie (INRAA), « Rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture », (2006), 67 p.
59. Chabi, R., « Production et utilisation des protéagineux (grains de fève, fèverole, pois et lupin) en alimentation animale en Algérie », *Mémoire de Master académique en nutrition animale et produits animaux*, Université de Tizi-Ouzou, (2015), 64 p.
60. Guillioni, L., Wéry, J. and Lecoœur, J., "High temperature and water deficit may reduce seed number in field pea purely by decreasing plant growth rate" *Funct. Plant Biol.*, 30, (2003), 1151-1164.
61. Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M. and Foolad, M.R., "Heat tolerance in plants: an overview", *Environ. Exp. Bot.*, 61, (2007), 199-223.
62. Parry, M.L., Rosenzweig, C., Iglesias, A., Livermore, M. and Fischer, G., "Effects of climate change on global food production under SRES emissions

- and socio economic scenarios”, *Glob. Environ. Change*, 14 (1), (2004), 53-67.
63. Ravasi, R.A., Paleari, L., Vesely, F.M., Movedi, E., Thoelke, W. and Confalonieri, R., “Ideotype definition to adapt legumes to climate change: A case study for field pea in Northern Italy”, *Agricultural and Forest Meteorology*, 291, (2020), 108081.
  64. Duzdemir, O., Kurunc, A. and Unlukara, A., “Response of pea (*Pisum sativum*) to salinity and irrigation water regime”, *Bulg. J. Agric. Sci.*, 15 (5), (2009), 400-409.
  65. Osman, A.S. and Rady, M.M., “Ameliorative effects of sulphur and humic acid on the growth, antioxidant levels, and yields of pea (*Pisum sativum* L.) plants grown in reclaimed saline soil”, *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 87 (6), (2012), 626-632.
  66. Saxena, N.P., “Selection for drought and salinity tolerance in cool season food legumes”, *In: Singh, K.B., Saxena, M.C.(eds) Breeding for stress tolerance in cool season food legumes*, ICARDA/John Wiley and Sons, Chichester, UK, (1993), 245-270.
  67. Hattab, S., Dridi, B., Chouba, L., Ben Kheder, M. and Bousetta H., “Photosynthesis and growth responses of pea *Pisum sativum* L. under heavy metals stress”, *Journal of Environmental Sciences*, 21, (2009), 1552-1556.
  68. Redden, B., Leonforte, T., Ford, R. and Croser, J.S., “Pea (*Pisum sativum* L.)”, *In: Singh, R.J. and Jauhar, P.P. (Eds.)*, Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement “Grain Legumes”, CRC Press, Boca Raton, (2005), 58-98.
  69. Clement, S.L., Hardie, D.C. and Elberson, L.R., “Variation among accessions of *Pisum fulvum* for resistance to pea weevil”, *Crop Science*, 42, (2002), 2167-2173.
  70. Rubiales, D, Fernandez-Aparicio, M., Perez-de-Luque, A., Prats, E., Castillejo, M.A., Sillero, J., Risipail, N. and Fondevilla, S., “Breeding approaches for crenate broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) management in pea (*Pisum sativum* L.)”, *Pest Manag. Sci.*, 65, (2009), 553-559.
  71. Khetarpal, R.K., Maury, Y., Cousin, R., Burghofer, A. and Varma, A., “Studies on resistance of pea to pea seed borne mosaic virus pathotypes”, *Ann. Appl. Biol.*, 116, (1990), 297-304.

72. Rubiales, D., Fernandez-Aparicio, M, Moral, A., Barilli, E., Sillero, J.F. and Fondevilla, S., "Disease Resistance in Pea (*Pisum sativum* L.) Types for Autumn Sowings in Mediterranean Environments", Czech J. Genet. Plant Breed., 45, (2009), 135-142.
73. Tiwari, K.R., Penner, G.A. and Warkentin, T.D., "Inheritance of powdery mildew resistance in pea", Can. J. Plant. Sci., 77, (1997), 307-310.
74. Fondevilla, S., Carver, T.LW., Moreno, M.T. and Rubiales, D., "Macroscopic and histological characterisation of genes *er1* and *er2* for powdery mildew resistance in pea", Eur. J. Plant Pathol., 115, (2006), 309-321.
75. Kushwaha, C., Chand, R., and Srivastava, C., "Role of aeciospores in outbreaks of pea (*Pisum sativum*) rust (*Uromyces fabae*)", Eur. J. Plant Pathol., 115, (2006), 323-330.
76. Laflamme, P., "Diseases of field pea (*Pisum sativum* L.) in the Peace River region of Alberta", Master of pest management, University of Alberta, Canada, (1998), 127 p.
77. Fourie, G., Steenkamp, E.T., Ploetz, R.C., Gordon, T.R. and Viljoen, A., "Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex", Infection, Genetics and Evolution, 11, (2011), 533-542.
78. Fusarium-ID, base de données, [www.fusariumdb.org](http://www.fusariumdb.org) , site consulté en mois de novembre, (2020).
79. Gordon, T.R. and Martyn, R.D., "The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*", Ann. Rev. Phytopathol., 35, (1997), 111-128.
80. Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. and Foster G.D., "The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology", Molecular Plant Pathology, 13, (2012), 414-430.
81. Geiser, D.M., Aoki, T., Bacon, C.W. *et al.*, "One fungus, one name: Defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use", Phytopathology, 103, (2013), 400-408.
82. Arroyo-Garcia, R., Cenis, J.L., Tello, J., Martinez-Zapater, JM. and Cifuentes, D., "Genetic relationships among seven specialized forms and AFLPs", Spanish Journal of Agricultural Research, 3, (2003), 55-63.

83. Barik, B. P., Tayung, K., Jagadev, P. N. and Dutta, S. K., "Phylogenetic Placement of an Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* Isolated from *Acorus calamus* Rhizomes with Antimicrobial Activity", E.J.B.S., 2 (1), (2010), 8-16.
84. Tello, J. C. and Lacas, A., "*Fusarium oxysporum* en los cultivos intensivos del litoral mediterraneo de Espana. Fases parasitica (Fusariosis vasculares del tomate y del clavel) y no parasitaria", Bol. San. Vegno., (1990), 19-190.
85. Di Pietro, A., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J. and Roncero, M.I., "*Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus", Mol. Plant Pathol., 4, (2003), 315-325.
86. Cunnington, J., Lindbeck, K., Rodney, H. and Jones, R., "Diagnostic methods for *Fusarium* wilt of chickpea (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*) Padil", Plant Biosecurity, (2009), 1-22.
87. Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K., "Formae specialis and races in *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases", 391-399, In: *Fusarium Diseases, Biology and Taxonomy*, Nelson, P. E., Tousson, T. A. and Cook, R. J. eds, Pennsylvania State University Park, (1981), 457 p.
88. Agrios, G.N., "Plant pathology", 5th edition. Department of plant pathology. University of Florida, Elsevier Academic Press, (2005), 948 p.
89. Jimenez-Gasco, M.D.M., Milgroom, M.G. and Jimenez-Diaz, R.M., "Stepwise evolution of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* inferred from fingerprinting with repetitive DNA sequences", Phytopathology, 94, (2004), 228-235.
90. Messiaen, C. M. et Cassini, R., « Systématique des *Fusarium* », Annales de Phytopathologie, 3, (1968), 386-454.
91. Booth, C., "The genus *Fusarium*", Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, (1971), 237 p.
92. Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O., "*Fusarium* species: An illustrated manual for identification", The Pennsylvania State University Press, University Park, (1983), 193 p.
93. Aoki, T., O'Donnell, K. and Geiser, D.M., "Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges", Journal of General Plant Pathology, 80, (2014), 189-201.

94. Gordon, T.R., "*Fusarium oxysporum* and the Fusarium wilt syndrome", Annual Review of Phytopathology, 55, (2017), 23-39.
95. Roncero, M.G., Hera, C., Ruiz-Rubio, M., Maceira, F.I.G., Madrid, M.P. *et al.*, "*Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens", Physiological and Molecular Plant Pathology, 62, (2003), 87-98.
96. Chakrabarti, A., "*Fusarium oxysporum*: A "Moving" View of Pathogenicity", Chapter 7, *In*: Horwitz, B.A. *et al.* Genomics of soil- and plant associated fungi, Soil Biology, 36, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany, (2013), 157-189.
97. Beckman, C.H. and Roberts, E.M., "On the nature and genetic basis for resistance and tolerance of fungal wilt diseases", Advances in Botanical Research, 21, (1995), 35-77.
98. Bacon, C.W., Porter, J.K., Norred, W.P. and Leslie, J.F., "Production of fusaric acid by *Fusarium* species", Applied and Environmental Microbiology, 62, (1996), 4039-4043.
99. Abouzeid, M.A., Boari, A., Zonno, M.C., Vurro, M. and Evidente, A., "Toxicity profiles of potential biocontrol agents of *Orobanche ramosa*", Weed Science, 52, (2004), 326-332.
100. Jiao, J., Zhou, B., Zhu, X., Gao, Z. and Liang, Y., "Fusaric acid induction of programmed cell death modulated through nitric oxide signalling in tobacco suspension cells", Planta, 238, (2013), 727-737.
101. Bani, M., Risipail, N., Evidente, A., Rubiales, D., and Cimmino, A., "Identification of the Main Toxins Isolated from *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* Race 2 and Their Relation with Isolates Pathogenicity", J. Agric. Food Chem., 62, (2014), 2574-2580.
102. Irzykowska, L., Bocianowski, J., Waskiewicz, A., Weber, Z., Karolewski, Z., Golinski, P., Kostecki, M. and Irzykowski, W., "Genetic variation of *Fusarium oxysporum* isolates forming fumonisin B-1 and moniliformin", Journal of Applied Genetics, 53, (2012), 237-247.
103. Michielse, C.B. and Rep, M., "Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*", Mol. Plant Pathol., 10, (2009), 311-324.
104. Di Pietro, A., Garcia-Maceira, F.I., Meglec, E. and Roncero, I.G., "A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis", Mol. Microbiol., 39, (2001), 1140-1156.

105. Risipail, N. and Di Pietro, A., "The transcription factor *Ste12* mediates the MAPK *Fmk1* pathway to control pathogenicity and sporulation in *Fusarium oxysporum*", *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 22, (2009), 830-839.
106. Jones, F.R. and Linford, M.B., "Pea Disease Survey in Wisconsin" *Wisc. Agric. Exp. Sta. Res. Bull. WI, USA*, 64, (1925), 3 p.
107. Linford, M.B., "A *Fusarium* Wilt of Peas in Wisconsin", *Wisc. Agric. Exp. Sta. Res. Bull. WI, USA*, 85, (1928), 43 p.
108. Goth, R.W. and Webb, R.E., "Sources and genetics of host resistance in vegetable crops", *In: Fungal Wilt Diseases of Plants* (ME Mace, AA Bell, CH Beckman, eds) Academic Press, New York, USA., (1981), 377-411.
109. Snyder, W.C., "A new vascular *Fusarium* wilt disease of peas", *Science*, 77, (1933), 327.
110. Haglund, W.A., "Fusarium wilts", *In: Compendium of Pea Diseases* (DJ Hagedorn, ed). *Am. Phytopath. Soc., Saint-Paul, MN, USA*, (1984), 22-24.
111. Haglund, W.A. and Kraft, J.M., "*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 5", *Phytopathology*, 60, (1970), 1861-1862.
112. Haglund, W.A. and Kraft, J.M., "*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 6: Occurrence and distribution", *Phytopathology*, 69, (1979), 818-820.
113. MacHardy, W.E. and Beckman, C.H., "Vascular wilt fusaria: infection and pathogenesis", *In: Nelson PE, Tousson TA, Cook RJ, eds. Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*, University Park, PA, USA, The Pennsylvania State University Press, (1981), 365-390.
114. Bani, M., "Multidisciplinary approaches including histological, biochemical and molecular tools to study the resistance mechanisms to fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* in pea (*Pisum sativum*)", PhD thesis, Department of genetics, University of Cordoba, Spain, (2015), 187 p.
115. Castillejo, M.A., Bani, M and Rubiales, D., "Understanding pea resistance mechanisms in response to *Fusarium oxysporum* through proteomic analysis", *Phytochemistry*, 115, (2015), 44-58.
116. Hagedorn, D.J., "Compendium of pea diseases", *American Phytopathol. Society, Saint-Paul, Minnesota, USA*, (1984), 57 p.
117. Guimaraes, E.P., Ruane, J., Scherf, B.D., Sonnino, A. and Dargie, JD., "Marker-Assisted Selection, Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish", *FAO, Rome*, (2007), 494 p.

118. Keiko, Y. and Nagisa, M., "Control of Fusarium Wilt of Pea and Occurrence conditions", Research Bulletin of the Aichi-ken Agricultural Research Center, 37, (2005), 105-110.
119. Strange, R.N., "Introduction to plant pathology", London, UK, Wiley, (2003), 446 p.
120. Jimenez-Díaz, R.M., Castillo, P., Jimenez-Gasco, M.D.M., Landa, B.B. and Navas-Cortes, J.A., "Fusarium wilt of chickpeas: Biology, ecology and management", Crop Protection, 73, (2015), 16-27.
121. Duniway, J.M., "Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil", Phytopathology, 92, (2002), 1337-1343.
122. Maisuria, V.B., Gohel, V., Mehta, A.N., Patel, R.R. and Chhatpar, H.S., "Biological control of Fusarium wilt of pigeonpea by *Pantoea dispersa*, a field assessment", Ann. Microbiol., 58 (3), (2008), 411-419.
123. Benchabane, M., Bakour, R., Toua, D. et Boutekrabt A., « Mise en évidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate », Bulletin OEPPL/EPPO, 30, (2000), 243-246.
124. Pal, K.K. and McSpadden-Gardener, B., "Biological control of plant pathogens. The plant health instructor", Biological Control, (2006), 25 p.
125. Toua, D., Benchabane, M., Bensaid, F. and Bakour, R., "Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of fusarium wilt in tomato and flax", African Journal of Microbiology Research, 7 (48), (2013), 5449-5458.
126. Taha, N.A., Bayoumi, Y.A. and Hagag, E.S., "Impact of Bio Safe Compounds and Resistance Inducers on Certain Soil Borne Diseases, Growth and Yield of Pea Plants (*Pisum sativum* L.)", J. Sus. Agric .Sci., 43 (3), (2017), 175-185.
127. Yala, A. Chouih, S., Rispaill N. et Benchabane, M., « Biocontrôle des trachéomycoses par les PGPR : cas de la fusariose du pois avec *Pseudomonas fluorescens* », Agrobiologia, 8 (2), (2018), 1110-1116.
128. Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B. and Cammue, B.P.A., "Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review", Biological Control, 144, (2020), 104240.
129. Grajal-Martin, M.J. and Muehlbauer, F.J., "Genomic location of the *Fw* gene for resistance to fusarium wilt race 1 in peas", Journal of Heredity, 93, (2002), 291-293.

130. Coyne, C.J., Inglis, D.A., Whitehead, S.J. and Muehlbauer, F.J., "Chromosomal location of *Fwf* in pea", *Pisum Genetics*, 32, (2000), 20-22.
131. Okubara, P.A., Inglis, D.A., Muehlbauer, F.J. and Coyne, C.J., "A novel RAPD marker linked to the Fusarium wilt race 5 resistance gene (*Fwf*) in *Pisum sativum*", *Pisum Genetics*, 34, (2002), 6-8.
132. Pilet-Nayel, M.L., Moury, B., Caffier, V., Montarry, J., Kerlan, M.C., Fournet, S., Durel C.E. and Delourme R., "Quantitative Resistance to Plant Pathogens in Pyramiding Strategies for Durable Crop Protection", *Front. Plant Sci.*, 8, (2017), 1838.
133. Abdullah, S.N.A. and Akhtar, M.S., "Plant and Necrotrophic Fungal Pathogen Interaction: Mechanism and Mode of Action", *In* K.R. Hakeem *et al.* (eds.), *Plant, Soil and Microbes*, Springer International Publishing Switzerland, (2016), 29-53.
134. Kant, P., Reinprecht, Y., Martin, C.J., Islam, R. and Pauls K.P., "Disease Resistance", *Comprehensive Biotechnology*, 3rd edition, 4, (2017), 789-805.
135. Mengiste, T., "Plant immunity to necrotrophs", *Annu. Rev. Phytopathol.*, 50, (2012), 267-294.
136. Poland, J.A., Balint-Kurti, P.J., Wisser, R.J., Pratt, R.C. and Nelson, R.J., "Shades of gray: the world of quantitative disease resistance", *Trends Plant Sci.*, 14, (2009), 21-29.
137. Kou, Y. and Wang, S., "Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance", *Curr. Opin. Plant Biol.*, 13, (2010), 181-185.
138. Nimchuk, Z. T., Eulgem, B. F. and Dangl, J. L., "Recognition and response in the plant immune system", *Annu. Rev. Genet.*, 37, (2003), 579-609.
139. Jones, D.A. and Takemoto, D., "Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen associated molecules", *Curr. Opin. Immunol.*, 16, (2004), 48-62.
140. Bohnert, H.U., Fudal, W., Diah, D., Tharrea, J., Notteghem, L. *et al.*, "A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice", *Plant Cell*, 16, (2004), 2499-2513.
141. Diener, A.C. and Ausubel, F.M., "Resistance to *Fusarium oxysporum* 1, a Dominant *Arabidopsis* Disease-Resistance Gene, Is Not Race Specific", *Genetics Society of America, Genetics*, 171, (2005), 305-321.

142. St Clair, D.A., "Quantitative disease resistance and quantitative resistance Loci in breeding", *Ann. Rev. Phytopathol.*, 48, (2010), 247-268.
143. Roux, F., Voisin, D., Badet, T., Balague, C., Barlet, X., Huard-Chauveau, C. et al., "Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map", *Mol. Plant Pathol.*, 15, (2014), 427-432.
144. Fukuoka, S., Saka, N., Mizukami, Y., Koga, H., Yamanouchi, U., Yoshioka, Y. et al., "Gene pyramiding enhances durable blast disease resistance in rice", *Sci. Rep.*, 5, (2015), 7773.
145. Ellur, R.K., Khanna, A., Yadav, A., Pathania, S., Rajashekara, H., Singh, V.K. et al., "Improvement of Basmati rice varieties for resistance to blast and bacterial blight diseases using marker assisted backcross breeding", *Plant Sci.*, 242, (2016), 330-341.
146. Iakovidis, M., Teixeira, P.J.P.L., Exposito-Alonso, M., Cowper, M.G., Law, T.F. et al., "Effector-triggered immune response in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative trait", *Genetics*, 204, (2016), 337-353.
147. Parlevliet, J.E., "Race-specific aspects of polygenic resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*", *Neth. J. Plant Pathol.*, 84, (1978), 121-126.
148. Simmonds, N.W., "Genetics of horizontal resistance to diseases of crops", *Biol. Rev.*, 66, (1991), 189-241.
149. Corwin, J.A. and Kliebenstein, D.J., "Quantitative resistance: more than just perception of a pathogen", *Plant Cell*, 29, (2017), 655-665.
150. Moore, D., Robson, G.D. and Trinci, A.P.J., "Preformed and induced defence mechanisms in plants", In *21<sup>st</sup> Century Guidebook to Fungi*, Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, (2011), 385-386.
151. Bednarek, P., "Chemical warfare or modulators of defence responses: the function of secondary metabolites in plant immunity", *Curr. Opin. Plant Biol.*, 15, (2012), 407-414.
152. Piasecka, A., Jedrzejczak-Rey, N. and Bednarek, P., "Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals", *New Phytol.* 206, (2015), 948-964.
153. Cowger, C. and Brown, J.K.M., "Durability of Quantitative Resistance in Crops: Greater Than We Know?", *Annu. Rev. Phytopathol.*, 57, (2019), 253-277.

154. Bevan, J.R., Taylor, J.D., Crute, I.R., Hunter, P.J. and Vivian, A., "Genetics of specific resistance in pea (*Pisum sativum*) cultivars to seven races of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*", *Plant Pathology*, 44, (1995), 98-108.
155. Barilli, E., Zatovic, S., Rubiales, D. and Torres, A.M., "Mapping of quantitative trait loci controlling partial resistance against rust incited by *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. in a *Pisum fulvum* L. intraspecific cross", *Euphytica*, 175, (2010), 151-159.
156. Fondevilla, S., Fernández-Aparicio, M., Satovic, Z., Emeran, A.A., Torres, A.M., Moreno, M.T. and Rubiales, D., "Identification of quantitative trait loci for specific mechanisms of resistance to *Orobanche crenata* Forsk. in pea (*Pisum sativum* L.)", *Molecular Breeding*, 25, (2010), 259-272.
157. Niks, R.E., Qi, X.Q. and Marcel, T.C., "Quantitative resistance to biotrophic filamentous plant pathogens: concepts, misconceptions and mechanisms," *Annual Review of Phytopathology*, ed. N. K. VanAlfen (Palo Alto, CA: Annual Reviews), (2015), 445-470.
158. Ellis, J.G., Lagudah, E.S., Spielmeier, W. and Dodds, P.N., "The past, present and future of breeding rust resistant wheat", *Front. Plant Sci.*, 5, (2014), 641.
159. Wiesner-Hanks, T. and Nelson, R., "Multiple disease resistance in plants," *Annual Review of Phytopathology*, eds J. E. Leach and S. Lindow (Palo Alto, CA: Annual Reviews), (2016), 229-252.
160. Kushalappa, A.C., Yogendra, K.N. and Karre, S., "Plant innate immune response: qualitative and quantitative resistance", *Crit. Rev. Plant Sci.*, 35, (2016), 38-55.
161. Parlevliet, J.E., "Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation", *Euphytica*, 124, (2002), 147-156.
162. Brown, J.K.M., "Durable resistance of crops to disease: a Darwinian perspective," *Annual Review of Phytopathology*, ed. N. K. VanAlfen (Palo Alto, CA: Annual Reviews), (2015), 513-539.
163. Palloix, A., Ayme, V. and Moury, B., "Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies", *New Phytol.*, 183, (2009), 190-199.

164. Mundt, C.C., "Durable resistance: a key to sustainable management of pathogens and pests", *Infect. Genet. Evol.*, 27, (2014), 446-455.
165. Kolmer, J.A. and Leonard, K.J., "Genetic selection and adaptation of *Cochliobolus heterostrophus* to corn host with partial resistance", *Phytopathology* 76, (1986), 774-777.
166. Lehman, J.S. and Shaner, G., "Selection of populations of *Puccinia recondite* f. sp. *tritici* for shortened latent period on a partially resistant wheat cultivar", *Phytopathology*, 87, (1997), 170-176.
167. Montarry, J., Cartier, E., Jacquemond, M., Palloix, A. and Moury, B., "Virus adaptation to quantitative plant resistance: erosion or breakdown?", *J. Evol. Biol.*, 25, (2012), 2242-2252.
168. Cowger, C. and Mundt, C.C., "Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars", *Phytopathology*, 92, (2002), 624-630.
169. Peressotti, E., Wiedemann-Merdinoglu, S., Delmotte, F., Bellin, D., Di Gaspero, G., Testolin, R., Merdinoglu, D. and Mestre, P., "Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety", *BMC Plant Biology*, 10, (2010), 147.
170. Caffier, V., Lasserre-Zuber, P., Giraud, M., Lascostes, M., Stievenard, R., Lemarquand, A., van de Weg, E. *et al.*, "Erosion of quantitative host resistance in the apple  $\times$  *Venturia inaequalis* pathosystem", *Infection, Genetics and Evolution*, 27, (2014), 481-489.
171. Caffier, V., Le Cam, B., Al Rifai, M., Bellanger, M.N., Comby, M., Denancé, C., Didelot, F., Expert, P., Kerdraon, T., Lemarquand, A., Ravon, E. and Durel C.E., "Slow erosion of a quantitative apple resistance to *Venturia inaequalis* based on an isolate-specific Quantitative Trait Locus", *Infection, Genetics and Evolution*, 44, (2016), 541-548.
172. Delmas, C.E.L., Fabre, F., Jolivet, J., Mazet, I. D., Cervera, S. R., Deliere, L. *et al.*, "Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew", *Evol. Appl.*, 9, (2016), 709-725.
173. Krattinger, S.G., Lagudah, E.S., Spielmeyer, W., Singh, R.P., Huerta-Espino, J. and McFadden, H., "A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat", *Science*, 323, (2009), 1360-1363.

174. Fukuoka, S., Saka, N., Koga, H., Ono, K., Shimizu, T. and Ebana, K., "Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice", *Science*, 325, (2009), 998-1001.
175. French, E., Kim, B.S. and Iyer-Pascuzzi, A.S., "Mechanisms of quantitative disease resistance in plants", *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 56, (2016), 201-208.
176. Foyer, C.H. and Noctor, G., "Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses", *Plant Cell*, 17, (2005), 1866-1875.
177. Miller, E.W., Dickinson, B.C. and Chang, C.J., "Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling", *PNAS*, 107, (2010), 15681-15686.
178. Díaz-Vivancos, P., Dong, Y.P., Ziegler, K., Markovic, J., Pallardo, F., Pellny, T.K., Verrier, P.J. and Foyer, C., "Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole cell redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defence shield", *Plant J.*, 64, (2010), 825-838.
179. Camejo, D., Martí, M.C., Jimenez, A., Cabrera, J.C., Olmos, E. and Sevilla, F., "Effect of oligogalacturonides on root length, extracellular alkalization and  $O_2^-$  accumulation in alfalfa", *J. Plant Phys.*, 168, (2011), 566-575.
180. Camejo, D., Guzman-Cedeno, A. and Moreno, A., "Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions", *Plant Physiology and Biochemistry*, 103, (2016), 10-23.
181. Apel, K. and Hirt, H., "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction", *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, (2004), 373-399.
182. Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M.A. and Mittler, R., "Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling", *Curr. Opin. Plant Biol.*, 14, (2011), 691-699.
183. Nathan, C. and Cunningham-Bussel, A., "Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species", *Nat. Rev. Immunol.*, 13, (2013), 349-361.
184. Gilroy, S., Suzuki, N., Miller, G., Choi, W.G., Toyota, M., Devireddy, A.R. and Mittler, R., "A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling", *Trends Plant Sci.*, 19, (2014), 623-630.

185. Bowler, C., Slooten, L., Vanderbranden, S., De Rycke, R., Botterman, J., Sybesma, C., Van Montagu, M. and Inze, D., "Manganese superoxyde dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radical in transgenic plants", *EMBO J.*, 10 (7), (1991), 1723-1732.
186. Foyer, C.H. and Fletcher, J.M., "Plant antioxidants: color me healthy", *Biologist (London)*, 48, (2001), 115-120.
187. Asada, K., "Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions", *Plant Physiol.*, 141 (2), (2006), 391-396.
188. Mohapatra, C., Chand, R., Navathe, S. and Sharma, S., "Histo-chemical and biochemical analysis reveals association of *er1* mediated powdery mildew resistance and redox balance in pea", *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, (2016), 54-63.
189. Beckman, C.H., "Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants", *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 57, (2000), 101-110.
190. Vidhyasekaran, P., "Fungal Pathogenesis in Plants and Crops: Molecular Biology and Host Defense mechanisms", CRC Press, Boca Raton, (2008), 536 p.
191. El Modafar, C., El Boustani, E., « Contribution des polyphénols aux mécanismes de défense biologique des plantes », *In: Regnault-Roger, C., Philogène, B., Vincent, C. (eds) Biopesticides d'origine végétale*, Lavoisier Tech. and Doc., (2002), 169-185.
192. Beckman, C.H., "The Nature of Wilt Diseases of Plants", *Am. Phytopath. Soc.*, Saint-Paul, Minnesota, USA, (1987), 175 p.
193. van Loon, L.C., "Pathogenesis-related proteins", *Plant Mol. Biol.*, 4, (1985), 111-116.
194. van Loon, L.C. and van Strien, E.A., "The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins", *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 55, (1999), 85-97.
195. van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M., "Significance of inducible defense-related proteins in infected plants", *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, (2006), 135-162.
196. Amey, R.C., Schleicher, T., Slinn, J., Lewis, M., Macdonald, H., Neill, S.J. and SpencerPhillips, P.T.N., "Proteomic analysis of a compatible interaction

- between *Pisum sativum* (pea) and the downy mildew pathogen *Peronospora viciae*” Eur. J. Plant Pathol., 122, (2008), 41-55.
197. Barilli E., Rubiales, D. and Castillejo, M.A., “Comparative proteomic analysis of BTH and BABA-induced resistance in pea (*Pisum sativum*) toward infection with pea rust (*Uromyces pisi*)”, Journal of Proteomics, 75 (17), (2012), 5189-5205.
  198. Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. and Jones, J.D., “Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism”, Annu. Rev. Phytopathol., 49, (2011), 317-343.
  199. Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Solano, R., Wisman, E., Ferrari, S., Ausubel, F.M. and Ecker, J.R., “Five components of the ethylene response pathway identified in a screen for weak ethylene insensitive mutants in *Arabidopsis*”, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100, (2003), 2992-2997.
  200. van Wees, S., Chang, H.S., Zhu, T. and Glazebrook, J., “Characterization of the early response of *Arabidopsis* to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling”, Plant Physiol., 132, (2003), 606-617.
  201. Cerna, H., Černý, M., Habánová, H., Šafářová, D., Abushamsiya, K., Navrátil, M. and Brzobohatý, B., “Proteomics offers insight to the mechanism behind *Pisum sativum* L. response to pea seed-borne mosaic virus (PSbMV)”, J. Proteomics, 153, (2017), 78-88.
  202. Müller, K.O. and Börger, H., “Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora*-Resistenz der Kartoffel”, Arbeiten aus der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, 23, (1941), 189-231.
  203. Kuc, J. and Rush, J.S., “Phytoalexins”, Archives of Biochemistry and Biophysics, 236, (1985), 455-472.
  204. Lamb, C.J., Ryals, J.A., Ward, E.R. and Dixon, R.A., “Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens”, BioTechnology, 10, (1992), 1436-1445.
  205. Iriti, M. and Faoro, F., “Chemical diversity and defense metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution”, International Journal of Molecular Sciences, 10, (2009), 3371-3399.

206. Großkinsky, D.K., van der Graaff, E. and Roitsch, T., "Phytoalexin transgenics in crop protection - Fairy tale with a happy end?", *Plant Science*, 195, (2012), 54-70.
207. Cruickshank, I.A.M. and Perrin, D.R., "Isolation of a phytoalexin from *Pisum Sativum* L.", *Nature*, 197, (1960), 799-800.
208. Glawischnig, E., "Camalexin", *Phytochemistry*, 68, (2007), 401-406.
209. Nugroho, L. and Verpoorte, R., "Secondary metabolism in tobacco", *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 68, (2002), 105-125.
210. Deavours, B.E. and Dixon, R.A., "Metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis in alfalfa", *Plant Physiology*, 138, (2005), 2245-2259.
211. Kodama, O., Miyakawa, J., Akatsuka, T. and Kiyosawa, S., "Sakuranetin, a flavanone phytoalexin from ultraviolet-irradiated rice leaves", *Phytochemistry*, 31, (1992), 3807-3809.
212. Ahuja, I., Kissen, R. and Bones, A.M., "Phytoalexins in defense against pathogens", *Trends in Plant Science*, 17, (2012), 73-90.
213. Ingham, J.L., "Phytoalexins from the Leguminosae". In *Phytoalexins* (Bailey, J.A. and Mansfield, J.W., eds), Blackie, (1982), 21-80.
214. Jasiński, M., Kachlicki, P., Rodziewicz, P., Figlerowicz, M. and Stobiecki, M., "Changes in the profile of flavonoid accumulation in *Medicago truncatula* leaves during infection with fungal pathogen *Phoma medicaginis*", *Plant Physiol. Biochem.*, 47, (2009), 847-853.
215. Saunders, J. and O'Neill, N., "The characterization of defense responses to fungal infection in alfalfa", *BioControl*, 49, (2004), 715-728.
216. Naoumkina, M., Farag, M.A., Sumner, L.W., Tang, Y., Liu, C.J. and Dixon R.A., "Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, (2007), 17909-17915.
217. Muth, D., Kachlicki, P., Krajewski, P., Przystalski, M. and Stobiecki, M., "Differential metabolic response of narrow leaf lupine (*Lupinus angustifolius*) leaves to infection with *Colletotrichum lupine*", *Metabolomics*, 5, (2009), 354-362.
218. Simons, R, Vincken, J.P., Bohin, M.C., Kuijpers, T.F., Verbruggen, M.A. and Gruppen, H., "Identification of prenylated pterocarpan and other isoflavonoids in *Rhizopus* spp. elicited soya bean seedlings by electrospray

- ionisation mass spectrometry”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 25, (2011), 55-65.
- 219.** Arman, M., “LC-ESI-MS characterisation of phytoalexins induced in chickpea and pea tissues in response to a biotic elicitor of *Hypnea musciformis* (red algae)”, *Nat. Prod. Res.*, 25, (2011), 1352-136.
- 220.** DiCenzo, G.L. and VanEtten, H.D., “Studies on the late steps of (+) pisatin biosynthesis: Evidence for (–) enantiomeric intermediates”, *Phytochemistry*, 67, (2006), 675-683.
- 221.** Kaimoyo, E. and VanEtten, H.D., “Inactivation of pea genes by RNAi supports the involvement of two similar O-methyltransferases in the biosynthesis of (+)-pisatin and of chiral intermediates with a configuration opposite that found in (+)-pisatin”, *Phytochemistry*, 69, (2008), 76-87.
- 222.** Borejsza-Wysocki, W., Borejsza-Wysocka, E. and Hrazdina, G., “Pisatin metabolism in pea (*Pisum sativum* L.) cell suspension cultures”, *Plant Cell Reports*, 16, (1999), 304-309.
- 223.** Coyne, C.J., Kumar, S., von Wettberg, E.J.B., Marques, E., Berger, J.D., Redden, R.J., Ellis, T.H.N., Brus, J., Zablazská, L. and Smýkal, P., “Potential and limits of exploitation of crop wild relatives for pea, lentil, and chickpea improvement”, *Legume Science*, 2 (2), (2020), e36.
- 224.** Smýkal, P., Coyne, C.J., Ambrose, M.J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W. and Varshney, R.K., “Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding”, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34 (1-3), (2015), 43-104.
- 225.** McPhee, K.E., “Pea”, *In: Chittaranjan, K.(ed) Genome mapping and molecular breeding in plants, Volume 3, Pulses, Sugar and Tuber Crops* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, (2007), 33-45.
- 226.** Ambrose, M., “Garden pea”, *In: Prohens J., Nuez, F. (eds) Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Umbelliferae, and Solanaceae*, Springer, New York, (2008), 3-26.
- 227.** Blixt, S., Folkesson, D. and Gottschalk, G., “Use of mutations for chromosome mapping and breeding in *Pisum*”, *In: Tsuchiya, T., Gupta, P.K., (eds) Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*, Elsevier Science, Amsterdam, (1991), 33-52.

228. Fondevilla, S., Carver, T.L.W., Moreno, M.T. and Rubiales, D., "Identification and characterization of sources of resistance to *Erysiphe pisi* Syd. in *Pisum* spp.", *Plant Breeding*, 126, (2007), 113-119.
229. Di Pietro, A. and Roncero, M.I.G., "Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pg1* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*", *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, (1998), 91-98.
230. Haglund, W.A., "A rapid method for inoculating pea seedlings with *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisii*", *Plant Disease*, 73 (6), (1989), 457-458.
231. McPhee, K.E., Tullu, A., Kraft, J.M. and Muehlbauer, F.J., "Resistance to fusarium wilt race 2 in the *Pisum* core collection", *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 124, (1999), 28-31.
232. Neumann, S. and Xue, A.G., "Reactions of field pea cultivars to four races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisii*", *Can. J. Plant Sci.*, 83, (2003), 377-379.
233. Teng, P.S. and James, W.C., "Disease and yield loss assessment", In: Waller JM, Lenne' JM, Waller SJ, eds. *Plant Pathologist's Pocketbook*, 3<sup>rd</sup> edn. Wallingford, UK, CAB International, (2002), 25-38.
234. Hartney, S., Carson, J. and Hadwiger, L.A., "The use of chemical genomics to detect functional systems affecting the non-host disease resistance of pea to *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*", *Plant Science*, 172, (2007), 45-56.
235. Bani, M., Cimmino, A., Evidente, A., Rubiales, D. and Rispaill, N., "Pisatin involvement in the variation of inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisii* spore germination by root exudates of *Pisum* spp. germplasm", *Plant Pathology*, 67, (2018), 1046-1054.
236. Preisig, C.L., Bell, J.N., Sun, Y.J., Hrazdina, .G, Matthews, D.E. and Van Etten, H.D., "Biosynthesis of the phytoalexin pisatin: isoflavone reduction and further metabolism of the product sophorol by extracts of *Pisum sativum*", *Plant Physiology*, 94 (3), (1990), 1444-1448.
237. Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P. and Hens, L., "Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture", *Front. Public Health*, 4, (2016), 148.
238. Eliazer Nelson, A.R.L., Ravichandran, K. and Antony, U., "The impact of the Green Revolution on indigenous crops of India", *J. Ethn. Foods*, 6, (2019), 8.

239. Lindsey, A.P.J., Murugan, S. and Renitta, R.E., "Microbial disease management in agriculture: Current status and future prospects", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, (2020), 101468.
240. Ciancio, A. and Mukerji, K.G. "Integrated management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria", Springer ed., Dordrecht, (2008), 419 p.
241. Pegg, G., "Life in black hole - The microenvironment of the vascular pathogen", Presidential Address, *Transactions of the British Mycological Society*, 85, (1985), 1-20.
242. Charchar, M. and Kraft, J.M., "Response of near-isogenic pea cultivars to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* Races 1 and 5", *Canadian Journal of Plant Science*, 69, (1989), 1335-1346.
243. Webster, J. and Weber, R.W.S., "Introduction to Fungi", Cambridge University Press, (2007), 875 p.
244. Tessier, B.J., Mueller, W.C. and Morgham, A.T., "Histopathology and ultrastructure of vascular response in Pea resistant or susceptible to *Fusarium oxysporum* f.sp. *pis*" *Phytopathology*, 80, (1990), 756-764.
245. Kraft, J.M., Larsen, R.C. and Inglis, D.A., "Diseases of pea", In: Allen, D.J. and Lenné J.M. (Eds), *The Pathology of Food and Pasture Legumes*, CAB International, Wallingford, UK, (1998), 325-370.
246. Chávez-Arias, C.C., Gómez-Caro, S. and Restrepo-Díaz, H., "Physiological, Biochemical and Chlorophyll Fluorescence Parameters of *Physalis Peruviana* L. Seedlings Exposed to Different Short-Term Waterlogging Periods and Fusarium Wilt Infection", *Agronomy*, 9, (2019), 213.
247. Heck, D.W., Ghini, R. and Bettiol, W., "Deciphering the suppressiveness of banana Fusarium wilt with organic residues", *Applied Soil Ecology*, 138, (2019), 47-60.
248. Ulloa, M., Hutmacher, R.B., Schramm, T., Ellis, M.L., Nichols, R., Roberts, P.A. and Wright, S.D., "Sources, selection and breeding of Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*) race 4 (FOV4) resistance in Upland (*Gossypium hirsutum* L.) cotton", *Euphytica*, 216, (2020), 109.
249. Alves, D.P., Tomaz, R.S., Laurindo, B.S., Laurindo, R.D.F., Cruz, C.D., Nick, C. and Silva, D.J.H.D., "Artificial neural network for prediction of the area under the disease progress curve of tomato late blight", *Sci. Agric.*, 74, (2017), 51-59.

- 250.** Lepoivre, P., « Les mécanismes de résistance et la spécificité parasitaire », In : *Phytopathologie*, 1ère édition, De Boeck et Larcier, Bruxelles, Belgique, (2003), 161-191.
- 251.** Pouzoulet, J., « Développement d'une méthodologie PCR en temps réel pour la détection et la quantification *in planta* des principaux champignons pathogènes associés aux maladies du bois de la vigne », thèse de doctorat, spécialité Interactions plantes micro-organismes, Univ. De Toulouse, France, (2012), 176 p.
- 252.** Hadwiger, L.A., Chiang, C.C. and Horovitz, D., “Expression of disease resistance response genes in near-isogenic pea cultivars following challenge by *Fusarium oxysporum* race 1”, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 40, (1992), 259-269.
- 253.** van der Does, H.C., Constantin, M.E., Houterman, P.M., Takken, F.L.W., Cornelissen, B.J.C., Haring, M.A., van den Burg, H.A. and Rep, M., “*Fusarium oxysporum* colonizes the stem of resistant tomato plants, the extent varying with the R-gene present”, *Eur. J. Plant Pathol.*, 154, (2019), 55-65.
- 254.** Buruchara, R.A. and Camacho, L., “Common bean reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in Central Africa”, *Journal of Phytopathology*, 148 (1), (2000), 39-45.
- 255.** Garces-Fiallos, F.R., de Borba, M.C., Schmidt, E.C., Bouzon, Z.L. and Stadnik, M.J., “Delayed upward colonization of xylem vessels is associated with resistance of common bean to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*”, *European Journal of Plant Pathology*, 149 (2), (2017), 477-489.
- 256.** Lu, G.Y., Guo, S.G., Zhang, H.Y., Geng, L.H., Martyn, R.D. and Xu, Y., “Colonization of fusarium wilt-resistant and susceptible watermelon roots by a green-fluorescent-protein tagged isolate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*”, *Journal of Phytopathology*, 162 (4), (2014), 228-237.
- 257.** Scott, J.C., McRoberts, D.N. and Gordon, T.R., “Colonization of lettuce cultivars and rotation crops by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, the cause of Fusarium wilt of lettuce”, *Plant Pathol.*, 63, (2014), 548-53.
- 258.** Bishop, C.D. and Cooper, R.M., “An ultrastructural study of root invasion in 3 vascular wilt diseases”, *Physiol. Plant Pathol.*, 22, (1983), 15-27.

259. Baayen, R.P. and Elgersma, D.M., "Colonization and histopathology of susceptible and resistant carnation cultivars infected with *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*", Neth. J. Plant Pathol., 91, (1985), 119-135.
260. Ouellette, G.B., Baayen, R.P., Simard, M. and Rioux, D., "Ultrastructural and cytochemical study of colonization of xylem vessel elements of susceptible and resistant *Dianthus caryophyllus* by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*", Can. J. Bot. 77, (1999), 644-663.
261. Grayer, R.J. and Kokubun, T., "Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants", Phytochemistry, 56, (2001), 253-263.
262. Yadeta, K.A. and Thomma, B.P.H.J., "The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens", Front. Plant Sci., 4, (2013), 97.
263. Pouralibaba, H.R., Pérez-De-Luque, A. and Rubiales, D., "Histopathology of the infection on resistant and susceptible lentil accessions by two contrasting pathotypes of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*", Eur. J. Plant Pathol., 148, (2017), 53-63.
264. Ye, X.Y. and Ng, T.B., "Isolation of pisumin, a novel antifungal protein from legumes of the sugar snap pea *Pisum sativum* var. *macrocarpon*", Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 134, (2003), 235-240.
265. Wang, H.X. and Ng, T.B., "An antifungal protein from the pea *Pisum sativum* var. *arvense* Poir", Peptides, 27, (2006), 1732-1737.
266. Bishop, C.D. and Cooper, R.M., "Ultrastructure of vascular colonization by fungal wilt pathogens. 2. Invasion of resistant cultivars", Physiol. Plant Pathol. 24, (1984), 277-289.
267. Benhamou, N. and Garand, C., "Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47", Phytopathology, 91, (2001), 730-740.
268. Cruickshank, I.A.M., "Studies on phytoalexins IV. Antimicrobial spectrum of pisatin", Australian Journal of Biological Sciences, 15, (1962), 147-159.
269. Christenson, J.A. and Hadwiger, L.A., "Induction of pisatin formation in the pea foot region by pathogenic and nonpathogenic clones of *Fusarium solani*", Phytopathology, 63, (1973), 784-790.

270. Van Etten, H.D., "Differential sensitivity of fungi to pisatin and phaseollin", *Phytopathology*, 63, (1973), 1477-1482.
271. Pueppke, S.G. and Van Etten, H.D., "The relation between pisatin and the development of *Aphanomyces euteiches* in diseased *Pisum sativum*", *Phytopathology*, 66, (1976), 1174-1185.
272. Hadwiger, L.A., Chang, M.M. and Parsons, M.A., "*Fusarium solani* DNase is a signal for increasing expression of nonhost disease resistance response genes, hypersensitivity and pisatin production", *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8, (1995), 871-879.
273. Hammerschmidt, R., "Phytoalexins: What Have We Learned After 60 Years?", *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37, (1999), 285-306.
274. Cruickshank, I.A.M., "Phytoalexins in the leguminosae with special reference to their selective toxicity", *Tagungsber. Dtsch. Akad. Landwirtschaftswiss*, Berlin, 74, (1965), 313-332.
275. Cruickshank, I.A.M., "Phytoalexins", *Annual Review of Phytopathology*, 1, (1963), 351-374.
276. Uehara, K., "Relationship between host specificity of pathogen and phytoalexins", *Ann. Phytopathol. Soc. (Jpn.)*, 29, (1964), 103-110.
277. Delserone, L.M., McCluskey, K.D., Matthews, E. and VanEtten, H.D., "Pisatin demethylation by fungal pathogens and nonpathogens of pea: association with pisatin tolerance and virulence", *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 55, (1999), 317-326.
278. Temporini, E.D. and VanEtten, H.D., "An analysis of the phylogenetic distribution of the pea pathogenicity (PEP) genes of *Nectria haematococca* MPVI supports the hypothesis of their origin by horizontal transfer and uncovers a potentially new pathogen of garden pea: *neocosmospora boniensis*", *Curr. Genet.*, 46, (2004), 29-36.
279. Gurr, S.J. and Rushton, P.J., "Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express?", *Trends in Biotechnology*, 23, (2005), 275-282.
280. Dixon, R.A., Lamb, C.J., Masoud, S.A., Sewalt, V.J. and Paiva, N.L., "Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses - a review", *Gene*, 179, (1996), 61-71.

- 281.** Dempsey, D.A., Silva, H. and Klessig, D.F., "Engineering disease and pest resistance in plants", *Trends in Microbiology*, 6, (1998), 54-61.
- 282.** Verpoorte, R., Contin, A. and Memelink, J., "Biotechnology for the production of plant secondary metabolites", *Phytochemical Review*, 1, (2002), 13-25.
- 283.** Verpoorte, R. and Memelink, J., "Engineering secondary metabolite production in plants", *Current Opinion in Biotechnology*, 13, (2002), 181-187.

## ARTICLE PUBLIÉ

**Mekhaldi, D.**, Rispaïl, N. et Benchabane, M., « Etude de comportement d'une collection de pois (*Pisum* spp.) face à la fusariose vasculaire », *Agrobiologia*, 10 (1), **(2020)**, 1837-1848.

## ÉTUDE DE COMPORTEMENT D'UNE COLLECTION DE POIS (*PISUM* SPP.) FACE À LA FUSARIOSE VASCULAIRE

MEKHALDI Delel<sup>1\*</sup>, RISPAIL Nicolas<sup>2</sup> et BENCHABANE Messaoud<sup>1</sup>

1. Laboratoire de Protection et de Valorisation des Ressources Agrobiologiques, Département des Biotechnologies, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Blida 1, Algérie.

2. Department of Plant Breeding, Institute for Sustainable Agriculture (IAS-CSIC), Cordoba, Spain.

Reçu le 10/12/2019, Révisé le 19/06/2020, Accepté le 24/06/2020

### Résumé

**Description du sujet :** La fusariose vasculaire présente un sérieux problème menaçant les cultures de pois. En raison de l'échec des procédures de lutte chimique, l'utilisation de cultivars résistants semble la méthode de lutte la plus adéquate pour favoriser les pratiques de l'agriculture durable.

**Objectifs :** Etude de niveau de résistance de 28 nouveaux génotypes de *Pisum* spp. issus de diverses lignées parentales, vis-à-vis de la fusariose vasculaire, dont deux génotypes cultivés localement et adaptés en Algérie (Merveille de Kelvedon et Séfrou).

**Méthodes :** Interaction des génotypes de *Pisum* spp. avec 4 souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* selon la technique d'inoculation par immersion racinaire dans les suspensions fongiques. L'expérimentation a été conduite dans des conditions semi-contrôlées sous serre en verre. Les comportements des génotypes de pois ont été analysés sur la base des symptômes exprimés, le taux d'infection, l'indice visuel de sévérité (VIS) et l'aire de progression de la maladie dans le temps (AUDPC).

**Résultats :** Les 4 souches du pathogène ont induit des symptômes typiques de la fusariose vasculaire chez le pois. A travers les paramètres étudiés, les analyses statistiques ont permis de classer le comportement des génotypes de pois selon l'expression de la maladie et leur interaction avec les souches inoculés.

**Conclusion :** Les paramètres d'évaluation ont permis de regrouper les interactions des 28 génotypes de pois avec les quatre souches pathogènes selon la gravité de la maladie. Les génotypes qui semblent tolérants ou relativement résistants à la fusariose vasculaire seront intégrés dans des programmes de sélection et d'amélioration des variétés cultivées.

**Mots clés :** *Pisum* spp. ; *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* ; génotypes ; comportement ; résistance.

## BEHAVIORAL STUDY OF PEA COLLECTION (*PISUM* SPP.) AGAINST FUSARIUM WILT

### Abstract

**Description of the subject:** Fusarium wilt is a serious problem threatening pea crops. Due to the failure of chemical control procedures, the use of resistant cultivars appears the most appropriate control method to promote sustainable agriculture practices.

**Objective:** Study of the resistance level of 28 new genotypes of *Pisum* spp. from various parental lines, against fusarium wilt, including two genotypes cultivated and adapted in Algeria (Kelvedon Wonder and Sefrou).

**Methods:** Interaction of *Pisum* spp. genotypes with 4 strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* using root immersion inoculation technique in fungal suspensions. The experiment was carried under semi-controlled conditions in a glass greenhouse. The behaviors of pea genotypes were analyzed based on expression of symptoms, the infection rate, the visual index of severity (VIS) and the area under the disease progress curve (AUDPC).

**Results:** The 4 pathogen strains induced typical symptoms of fusarium wilt. According to studied parameters, statistical analyses allowed the classification of pea's genotypes according to disease expression and their interaction with the inoculated strains.

**Conclusion:** The evaluation parameters permitted classification of the 28 pea genotypes with the four pathogenic strains according to the disease severity. Genotypes that seem tolerant or relatively resistant to fusarium wilt will be integrated into breeding and varieties selection programs.

**Keywords:** *Pisum* spp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*, genotypes, behavior, resistance.

\* Auteur correspondant: MEKHALDI Delel, E-mail: delelagro@yahoo.fr

## INTRODUCTION

Les légumineuses alimentaires sont connues parmi les cultures les plus importantes dans le monde, notamment dans les pays du bassin méditerranéen. Elles offrent un apport en protéines végétales pour l'alimentation humaine et animale et constituent un excellent précédent culturel dans les systèmes de production céréalière. Le pois (*Pisum sativum* L.) est compté comme la troisième légumineuse la plus cultivée dans le monde, en raison de sa consommation alimentaire croissante et de son adaptation, à la fois, aux régions chaudes de la Méditerranée et aux régions tempérées. Selon les statistiques de la FAO de l'an 2017, plus de 10 millions d'hectares de pois ont été cultivés dans le monde. Leur production a augmenté de 22,9 millions de tonnes en 2000 à près de 37 millions de tonnes en 2017 [1]. En Algérie, 46 280 ha ont été cultivés en pois frais et secs l'an 2018 avec une production de 197 675 tonnes [1]. Cette plante est considérée parmi les plus anciennes cultures domestiquées [2]. Bien qu'elle se pratique comme une culture homogène [3], une certaine hétérogénéité a été signalée chez des variétés traditionnelles et chez des cultivars et des génotypes anciens [4]. Le rendement des cultures de pois peut être affecté par divers stress biotiques, entre autre la fusariose vasculaire. L'agent pathogène en cause, *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (Fop), est un champignon du sol qui provoque de graves pertes dans tous les pays où le pois est cultivé [5]. Ce pathogène tellurique peut survivre sous forme de chlamydospores, qui peuvent rester viables dans le sol pendant plus de 10 ans [6]. Fop est représenté principalement par quatre races différentes, classées selon leur capacité à induire la maladie dans un ensemble de lignées différentielles. Parmi ces races, les races 1 et 2 ont été signalées dans le monde entier [7]. Le contrôle de cette maladie se fonde principalement sur l'intégration des différentes méthodes de gestion, y compris les pratiques culturales [8], la désinfection des sols [9], le biocontrôle [10, 11] et l'amélioration de la résistance des génotypes cultivés [12, 13]. Bien qu'un programme de lutte intégrant toutes ces mesures doit être appliqué, l'utilisation de cultivars résistants reste l'approche la plus adéquate et la plus adaptées aux pratiques de l'agriculture durable [14]. Pour améliorer la résistance des cultivars, les génotypes sauvages ou cultivés sont considérés comme une source potentielle de gènes.

Donc, le criblage de collections de ces génotypes constitue une étape indispensable

dans la recherche de nouvelles sources de résistance naturelle. Cependant, avant de pouvoir être utilisées dans les programmes d'amélioration des plantes, leurs niveaux de résistance à Fop doivent être évalués. Dans ce contexte, le présent travail vise à étudier le comportement d'une collection de 28 nouveaux génotypes de *Pisum* spp. issus de diverses lignées parentales, vis-à-vis de quatre souches de Fop, dont deux génotypes cultivés localement et adaptés en Algérie (Merveille de Kelvedon et Séfrou). Les expérimentations sont conduites en condition semi-contrôlées sous serre en verre en Algérie (département des Biotechnologies de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, université Blida 1), afin de les utiliser ultérieurement comme sources de gènes de résistance. Ces génotypes font l'objet d'une recherche approfondie de leur comportement face à de nombreux stress biotiques (mildiou, oïdium et orobanche) et abiotiques (sécheresse et salinité) au niveau de l'institut de l'agriculture durable (IAS-CSIC, Cordoue, Espagne), dans le but d'élargir leur aire de culture dans les pays de la région méditerranéenne.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

L'étude concerne une collection de 28 génotypes issus de populations spontanées et de variétés cultivées de *Pisum* spp. Les génotypes appartiennent aux deux espèces *P. fulvum* et *P. sativum*. Cette dernière renferme plusieurs sous-espèces à savoir *sativum*, *arvense*, *elatius*, *jormadi* et *syriacum*. Les semences des deux génotypes Séfrou et Merveille de Kelvedon, cultivés localement, ont été fournies par l'Institut Technique des Grandes Cultures de Sétif (ITGC, Sétif). Leur utilisation dans notre travail a pour objectif d'évaluer leur comportement vis-à-vis de Fop. Les semences des 26 autres génotypes sont issues de l'Institut de l'Agriculture Durable de Cordoue (IAS-CSIC, Cordoba, Spain) (Tableau 1).

### 2. Matériel fongique

Quatre souches de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (R1, R2F42, Arg1 et Arg3) fournies par l'IAS-CSIC (Cordoue, Espagne) sont utilisées dans les inoculations fongiques.

La souche R1 appartient à la race 1, alors que les souches R2F42, Arg1 et Arg3 sont de la race 2 (Tableau 2).

La régénération des souches fongiques, fournies initialement sous forme mycélienne sur papier filtre stérilisé, a été réalisée par ensemencement sur le milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*) et incubation à 28°C pendant cinq jours.

### 3. Suspensions fongiques

Les suspensions fongiques ont été préparées en prélevant des disques mycéliens à partir des cultures de Fop âgées de 4 à 5 jours (sur milieu PDA). Les disques ont été mis dans des flacons contenant 200 ml du milieu liquide PDB (*Potato Dextrose Broth*) et incubés à 25°C, sous agitation continue (170 rpm). Après 5 jours, les spores sont récupérées par filtration de la suspension à travers les mailles de 2 compresses stériles. À l'aide d'une cellule de Malassez, la concentration des filtrats a été ajustée à  $5 \times 10^6$  spores/ml [15].

### 4. Pré-germination des graines

Les graines des différents génotypes ont été superficiellement désinfectées pendant 20 min dans une solution d'hypochlorite de sodium (20%) puis rincées deux fois avec de l'eau distillée stérile. Elles sont par la suite enveloppées dans un papier filtre stérilisé et humecté et placées dans des boîtes de Pétri et mises en incubation à 25 °C. Après leur germination, les graines sont transférées dans des pots de 250 ml de volume contenant de la perlite stérilisée (à deux reprises à 250°C pendant 1h). Les pots sont ensuite maintenus sous serre en polycarbonate en conditions ambiantes (température :  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , hygrométrie : 60-70%, photopériode : 10h jour/14h nuit).

### 5. Inoculation des plantules

Pour procéder à l'inoculation avec les souches de Fop, nous avons appliqué la méthode d'immersion des racines décrite par Haglund [15]. Au stade de deux à trois nœuds, les plantules sont dépotées et leurs racines sont délicatement lavées sous l'eau du robinet pour enlever le substrat de culture adhérent (perlite stérile). Un tiers du système racinaire a été coupé du reste de la racine, avant l'immersion dans la suspension de spores fongiques, pendant 5 min à la température ambiante. Les témoins sont traités de la même façon en remplaçant la suspension fongique par l'eau distillée stérile. Tous les traitements effectués (inoculation des 28 génotypes par les quatre souches + témoins) ont été répétés 6 fois. Après l'inoculation, les plantules de pois sont transplantées dans leurs pots et incubées sous serre jusqu'à la fin de l'expérimentation, avec des arrosages à l'eau courante selon le besoin.

## 6. Paramètres étudiés

- *Symptomatologie* : après sept jours d'inoculation, l'évaluation du comportement des différents génotypes a été effectuée périodiquement, après trois jours, durant une période de végétation de 31 jours. La notation des symptômes s'est basée sur le descriptif symptomatologique typique de la maladie adopté dans plusieurs travaux [5, 6, 13, 16]. Les symptômes s'expriment dès les premiers stades végétatifs par un flétrissement et un jaunissement des feuilles suivis par un dessèchement et/ou la mort de la plante.

- *Taux d'infection (TI%)* : Il s'agit d'un paramètre distinctif [13, 14, 17], utilisé pour différencier les réactions des génotypes de *Pisum* spp. Il est représenté par la proportion de feuilles symptomatiques par rapport au nombre total de feuilles.

- *Sévérité des symptômes (VIS Visual Index of Severity)* : Cet indice de sévérité est le mieux indiqué dans plusieurs études pour évaluer la résistance du pois vis-à-vis de la fusariose vasculaire [13, 17, 18]. L'utilisation de l'échelle de sévérité des symptômes apporte une meilleure quantification de la maladie, car elle considère les symptômes au niveau de la feuille et donne une meilleure idée de la proportion affectée chez la plante, reflétant ainsi le degré et la quantité de la maladie. L'échelle utilisée contient 5 niveaux [13] (Fig. 1). La valeur finale est représentée par la moyenne des valeurs VIS de l'ensemble des feuilles de chaque plante.

- *AUDPC (Area Under Disease Progress Curve)* : Nous avons calculé l'AUDPC qui intègre l'intensité des symptômes et leur progression dans le temps. Les valeurs des taux d'infection ont été utilisées pour le calculer selon l'équation suivante [19] :

$$\text{AUDPC} = \sum \left[ \frac{x_i + x_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t) \right]$$

Dont :  $x_i$  : taux d'infection estimé à la date  $i$  ;  $x_{i+1}$  : taux d'infection estimé à la date  $i+1$  ;  $t_{i+1}$  : nombre de jours entre la date  $i$  et la date  $i+1$ .

Les calculs des valeurs effectives des taux d'infection, des VIS et des AUDPC ont été réalisés comparativement aux témoins sains.

## 7. Analyse statistique

Les résultats des valeurs VIS, des taux d'infection et des valeurs AUDPC ont subi une analyse de variance (ANOVA) en utilisant le logiciel statistique «Systat» vers. 12. Le calcul des moyennes des VIS, des taux d'infection et des valeurs AUDPC a été effectué en utilisant le même logiciel, dont les différences sont

significatives en se basant sur la plus petite différence au seuil  $\alpha \leq 5\%$ .

Tableau 1 : Génotypes du pois étudiés.

Génotypes de pois	Espèces correspondantes	Source
JI 1412, JI 1760, JI 1559, JI 2480, Radley, Polar, Messire, 74SN5, New Season, 1123, 2946	<i>Pisum sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	IAS-CSIC, Cordoue, Espagne
Merveille de Kelvedon	<i>Pisum sativum</i> ssp. <i>sativum</i>	ITGC, Sétif, Algérie
P21, P614, P615	<i>P. sativum</i> ssp. <i>elatius</i>	IAS-CSIC, Cordoue, Espagne
P42, P627, P632, P633, P634, P638	<i>P. sativum</i> ssp. <i>arvense</i>	IAS-CSIC, Cordoue, Espagne
Séfrou	<i>P. sativum</i> ssp. <i>arvense</i>	ITGC, Sétif, Algérie
P650	<i>P. sativum</i> ssp. <i>jormadi</i>	IAS-CSIC, Cordoue, Espagne
P665	<i>P. sativum</i> ssp. <i>syriacum</i>	IAS-CSIC, Cordoue, Espagne
P656, P316, P669, P651	<i>P. fulvum</i>	IAS-CSIC, Cordoue, Espagne

Tableau 2 : Souches de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (Fop).

Souche de Fop	Race	Origine et provenance
R1	Race 1	Souches de référence USDA-ARS, Pullman, USA (IAS-CSIC, Cordoue, Espagne)
R2F42	Race 2	
Arg1 et Arg3	Race 2	Isolées à partir des plantes symptomatiques et identifiées par PCR (IAS-CSIC, Cordoue, Espagne)



Figure 1 : Echelle de l'évaluation des symptômes de la fusariose vasculaire [13].

(1) Feuille verte saine ; (2) initiation d'un jaunissement et d'un flétrissement ou d'un enroulement de la feuille ; (3) jaunissement ou flétrissement de plus de 50% de la feuille ; (4) jaunissement ou flétrissement complet de la feuille ; (5) feuille morte.

## RÉSULTATS

### 1. Symptomatologie

Les premiers symptômes de la fusariose vasculaire du pois, ont été détectés sur les génotypes Messire, P21 et 2946, 7 à 10 jours après l'inoculation. Les symptômes de la maladie apparaissent sur les premières feuilles et atteignent progressivement les jeunes feuilles jusqu'au dessèchement complet et la mort de la plante entière de certains génotypes comme c'est le cas du génotype Messire infecté par la souche R2F42 (Fig. 2). Au niveau foliaire, les symptômes débutent par le jaunissement et/ou la courbure vers le bas des extrémités du limbe. Le jaunissement progresse ensuite à travers la feuille et s'associe avec une nécrose progressive jusqu'à ce que la feuille entière flétrisse et se dessèche (Fig. 2).

Les quatre souches de Fop utilisées provoquent le même tableau symptomatologique sur les génotypes étudiés. Dans nos essais en conditions semi-contrôlées, nous avons constaté que la souche R2F42 cause des symptômes plus intenses sur les génotypes susceptibles tels que Messire, P21, P634, P669, et Séfrou (Fig. 3). Pour une même souche, la réponse de chaque génotype a été très variable. Généralement, les symptômes de flétrissement progressent beaucoup plus rapidement chez les génotypes Messire, P21 et 2946 que chez d'autres tels que Radley, Merveille de Kelvedon et P665. En parallèle avec les symptômes foliaires, la souche R2F42, appartenant à la race 2 du pathogène, a causé une décoloration rouge foncé à brun sur les racines et le collet de la plupart des génotypes testés. Les souches R1, Arg1 et Arg3 de Fop n'ont pas causé cette décoloration, et les racines et collet de tous les génotypes inoculés avec ces souches ont présenté une couleur normale (Fig. 4).

### 2. Taux d'infection et VIS

Les différentes méthodes d'évaluation de la maladie ont révélé une grande variabilité chez les interactions étudiées (souches de Fop et génotypes du pois). Ainsi, l'analyse de la variance des valeurs de taux d'infection et de VIS a mis en évidence des différences très hautement significatives entre les comportements des 28 génotypes suite à leur inoculation avec les quatre souches de Fop ( $p < 0,005$ ).

Selon les taux d'infection enregistrés, les deux génotypes JI 1760 et 74SN5 sont les plus résistants à la souche Arg 1 ( $TI < 5\%$ ), tandis que les quatre génotypes 2946, P21, P634 et Messire sont les plus sensibles à la souche R2F42 ( $TI > 60\%$ ). Quant aux valeurs VIS, le génotype P627 inoculé avec la souche R1, s'est avéré le plus susceptible ( $VIS = 2,56$ ), suivi par P633 (2,52), P615 (2,47), P665 (2,41), P650 (2,29), Séfrou (2,23) et 2946 (2,15). Les deux génotypes qui s'avèrent les moins susceptibles envers cette souche sont Radley et P651 ( $VIS < 1,2$ ) (Fig. 5.A). En interaction avec la souche R2F42, les génotypes 2946 et P21 s'avèrent les plus sensibles ( $VIS > 4$ ). Les génotypes qui sont les plus résistants sont Radley, P656, P651, JI 1559 et Merveille de Kelvedon ( $VIS < 1,5$ ) (Fig. 5.B). Tous les génotypes étudiés inoculés avec la souche Arg1, ont enregistré des valeurs VIS inférieures à 2,5 (Fig. 5.C). En interaction avec la souche Arg3, les deux génotypes 2946 et P615 ont présenté des valeurs VIS dépassant la valeur de 2. Les autres génotypes ont enregistré des valeurs inférieures à 2 (Fig. 5.D).

En prenant les cinq génotypes Merveille de Kelvedon, P651, P21, 2946 et 74SN5 comme exemple (Fig. 6), nous constatons que la cinétique des valeurs VIS durant la période du suivi a révélé la progression très rapide de la maladie chez les génotypes inoculés avec la souche R2F42, avec laquelle l'apparition des premiers symptômes a été notée à partir du 7<sup>ème</sup> ou 10<sup>ème</sup> jour après l'inoculation. La seule exception est le génotype Merveille de Kelvedon qui a montré un temps de latence plus long, puisque les symptômes n'ont commencé à être visibles qu'à partir du 22<sup>ème</sup> jour (Fig. 6). En interaction avec les souches R1, Arg1 et Arg3, les génotypes qui sont avérés les plus susceptibles (2946 et P21), ont développé les premiers symptômes à partir du 7<sup>ème</sup> jour pour atteindre des valeurs avoisinant 3, 16 jours après l'inoculation. Les génotypes les plus résistants (Merveille de Kelvedon et P651) ont enregistré une cinétique très lente avec apparition des premiers symptômes 13 jours (R1), 16 jours (Arg1) et 19 jours (Arg3) après leur inoculation (Fig. 6).

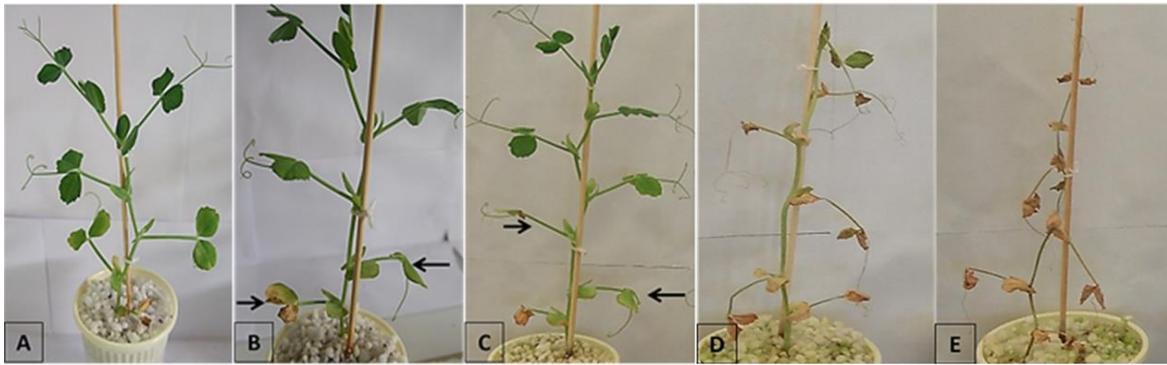


Figure 2 : Progression des symptômes de la fusariose vasculaire chez le génotype Messire inoculé avec la souche R2F42.

(A) 7 jours, (B) 13 jours, (C) 19 jours, (D) 27 jours et (E) 31 jours après l'inoculation.

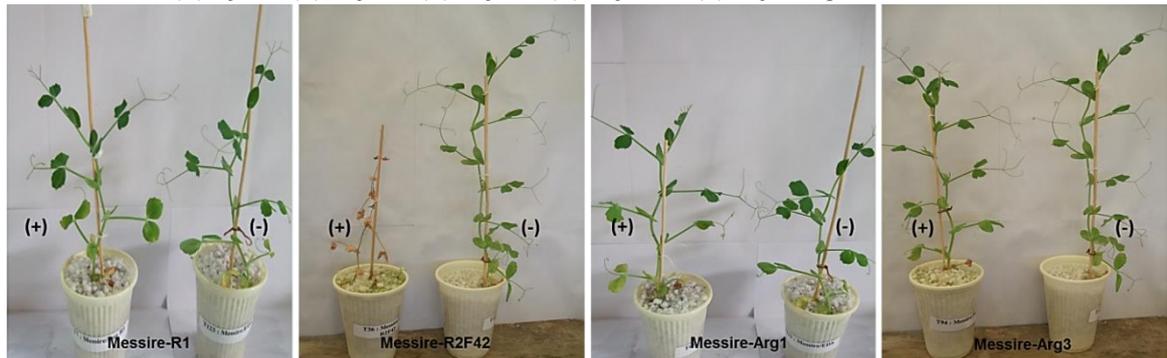


Figure 3 : Comportement du génotype Messire 31 jours après l'inoculation.

(+) Plante inoculée, (-) plante non inoculée (témoin).

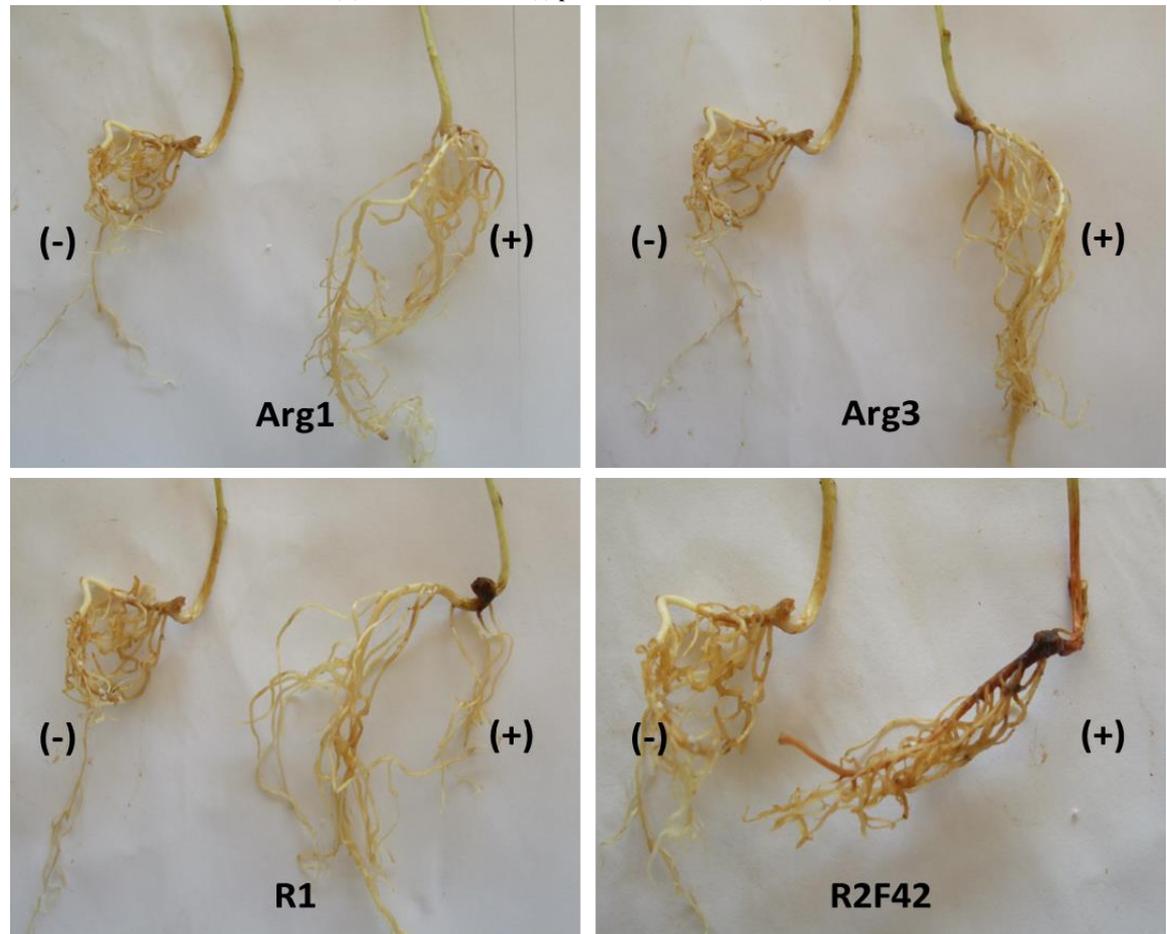


Figure 4 : Aspect des racines du génotype P632, 31 jours après l'inoculation.

(+) Plante inoculée, (-) plante non inoculée (témoin).

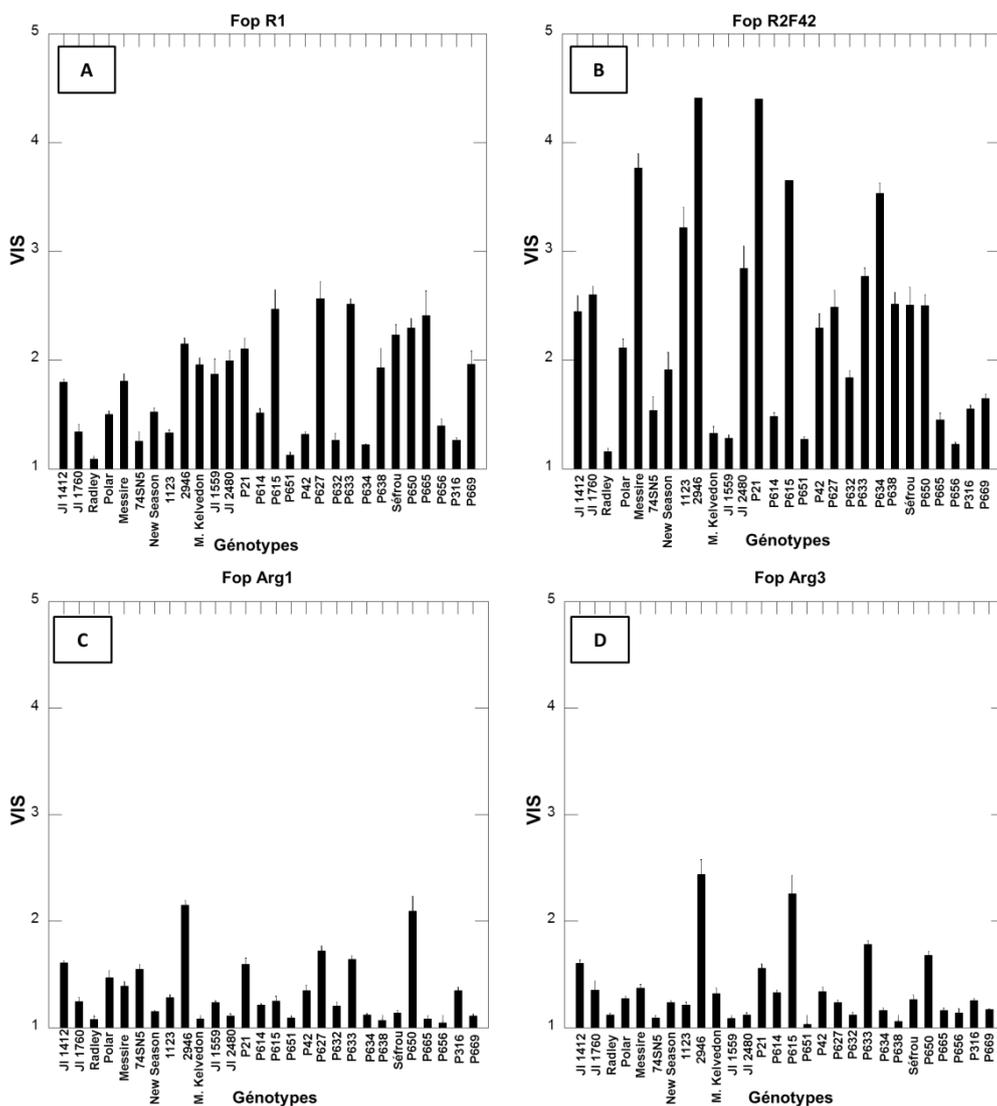


Figure 5 : Valeurs effectives de VIS des 28 génotypes de pois 31 jours après l'inoculation.

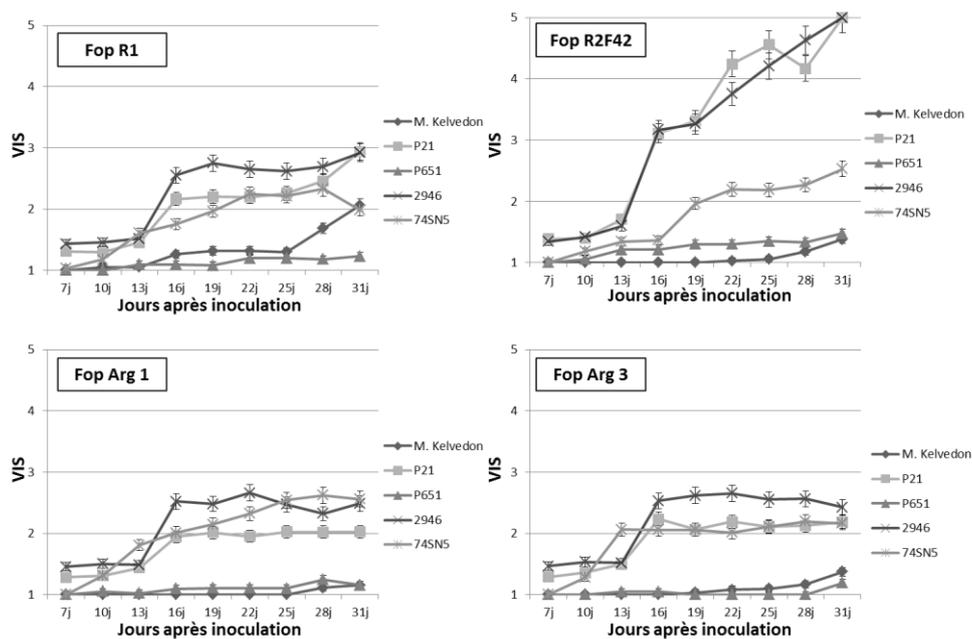


Figure 6 : Evolution des valeurs VIS des génotypes 74SN5, 2946, P21, P651, et Merveille de Kelvedon.

### 3. AUDPC

En interaction avec la souche R1, les valeurs les plus importants ont été enregistrés chez les génotypes P627, P633 et 2946 (AUDPC > 600), tandis que les plus faibles ont été enregistrés chez les génotypes Radley et P651 (AUDPC < 150) (Fig. 7.A). En interaction avec la souche R2F42, les génotypes P21, 2946 et P615 sont les plus sensibles (AUDPC > 900), alors que les génotypes Merveille de Kelvedon, JI 1559 et Radley sont les plus résistants (AUDPC < 250) (Fig. 7.B). En interaction avec la souche Arg1, le génotype le plus sensible était 2946, suivi par les génotypes P627 et P633 (AUDPC > 550). Les trois génotypes Merveille de Kelvedon, New Season et JI 1559 étaient les plus résistants (AUDPC < 105) (Fig. 7.C). Pour la souche Arg3, le génotype 2946 est le plus sensible, suivi par le génotype P633. Le génotype JI 1559 est le plus

résistant à cette souche suivi par les génotypes P651, JI 2480 et P632 (Fig. 7.D, Tableau 3).

Le calcul des valeurs minimales et maximales d’AUDPC 4 groupes distincts (Fig. 8) :

Groupe A : JI1559 a enregistré des AUDPC < 250.

Groupe B : JI1412, JI 1760, Radley, Polar, 74SN5, New Season, Merveille de Kelvedon, JI2480, P651, P42, P632, P656, P316 et P699, ont montré des valeurs relativement faibles ( $0 \leq \text{AUDPC} \leq 500$ ).

Groupe C : Messire, 1123, P627, P633, P634, P638, Séfrou et P650 ont enregistré des valeurs intermédiaires ( $100 \leq \text{AUDPC} \leq 750$ ).

Groupe D : 2946, P21 et P615 qui ont enregistré les AUDPC les plus élevés ( $250 \leq \text{AUDPC} \leq 1000$ ).

Le génotype P665 a enregistré les plus grandes variations fluctuant entre 0 et plus de 500 indiquant une différence très marquée de susceptibilité selon la souche de *Fop* testée.

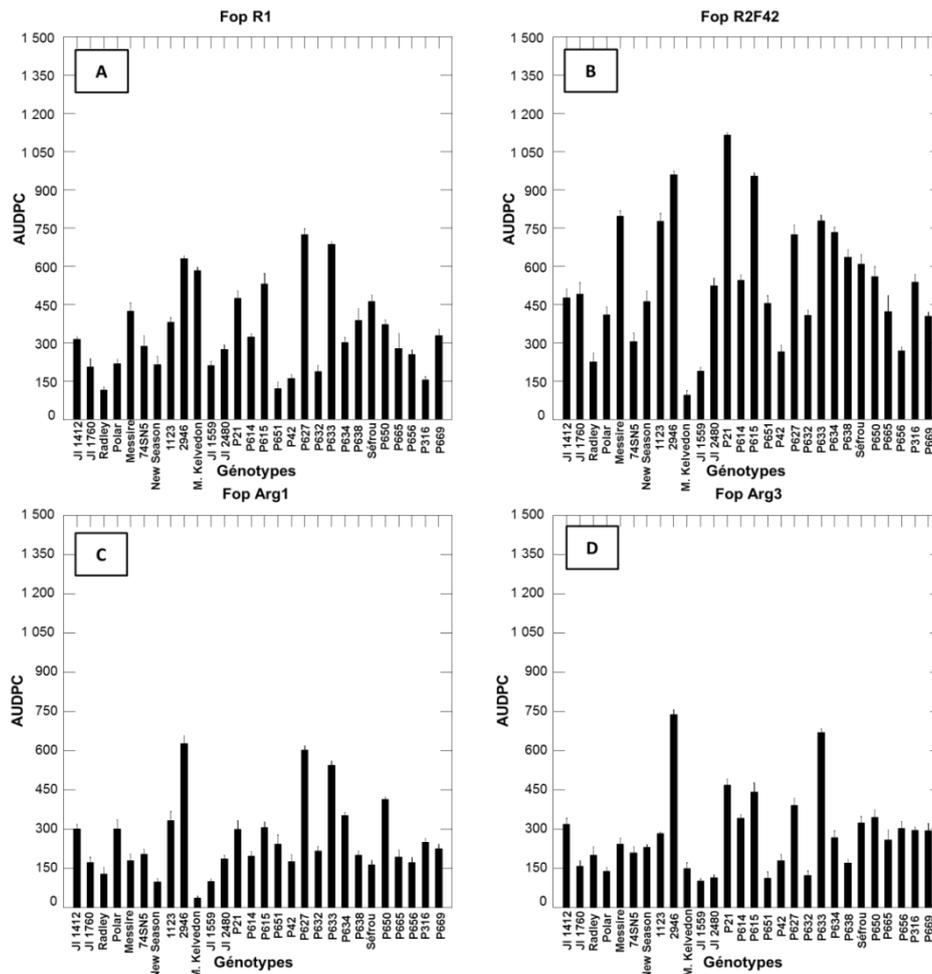


Figure 7 : Valeurs effectives d’AUDPC des 28 génotypes de pois.

Tableau 3 : Valeurs moyennes d'AUDPC des 28 géotypes de pois.

Géotypes	Souches de Fop			
	R1	R2F42	Arg1	Arg3
JI 1412	321,9 ± 6,4	482,3 ± 5,4	301,8 ± 6,6	318,2 ± 6,5
JI 1760	202,9 ± 13,6	502,3 ± 5,6	174,5 ± 5,1	161,9 ± 4,4
Radley	103,8 ± 5,3	221,2 ± 8,5	138,5 ± 6,7	203,3 ± 6,1
Polar	212,1 ± 6,2	403,1 ± 6,2	304,3 ± 8,9	146,1 ± 8,8
Messire	423,8 ± 6,9	802,8 ± 3,1	187,6 ± 6,1	249,9 ± 4,7
74SN5	291,2 ± 9,8	305,0 ± 8,5	213,9 ± 5,5	225,1 ± 5,5
New Season	211,3 ± 7,2	462,1 ± 5,9	101,9 ± 2,7	241,1 ± 3,1
1123	376,7 ± 6,6	790,0 ± 3,4	348,4 ± 7,6	287,2 ± 1,5
2946	625,3 ± 3,2	957,7 ± 2,6	639,2 ± 4,2	748,3 ± 3,4
M. Kelvedon	596,5 ± 3,4	98,3 ± 4,9	42,5 ± 2,8	152,5 ± 4,6
JI 1559	210,1 ± 8,8	202,5 ± 4,2	104,8 ± 3,2	99,4 ± 2,6
JI 2480	268,7 ± 9,2	526,1 ± 4,8	195,3 ± 3,5	108,1 ± 5,9
P21	478,4 ± 5,3	1121,1 ± 1,9	304,5 ± 9,1	474,2 ± 5,2
P614	324,4 ± 7,5	548,6 ± 4,7	206,8 ± 7,6	350,9 ± 7,1
P615	526,9 ± 15,3	952,6 ± 2,1	307,9 ± 8,3	446,5 ± 7,2
P651	105,1 ± 7,7	455,1 ± 5,5	248,2 ± 11,0	103,5 ± 3,4
P42	152,9 ± 5,4	250,5 ± 10,1	177,5 ± 11,1	180,2 ± 7,1
P627	742,2 ± 4,8	736,8 ± 3,7	606,9 ± 3,4	389,2 ± 6,5
P632	193,2 ± 6,6	405,6 ± 6,1	219,1 ± 4,1	119,9 ± 4,4
P633	688,1 ± 2,9	787,6 ± 3,2	553,3 ± 4,4	682,1 ± 3,7
P634	300,7 ± 8,2	748,1 ± 3,2	350,2 ± 7,3	263,4 ± 9,9
P638	389,1 ± 7,6	651,6 ± 3,7	211,3 ± 4,4	172,9 ± 6,1
Séfrou	455,9 ± 6,1	605,8 ± 4,3	152,6 ± 5,7	321,6 ± 8,0
P650	371,7 ± 6,5	557,1 ± 4,8	416,9 ± 3,8	353,7 ± 7,6
P665	271,7 ± 12,7	436,5 ± 12,7	200,1 ± 6,1	260,2 ± 6,9
P656	252,1 ± 9,9	251,9 ± 9,7	175,7 ± 6,6	305,1 ± 8,9
P316	151,7 ± 3,3	544,4 ± 5,1	252,1 ± 9,8	299,2 ± 8,2
P669	329,2 ± 7,6	403,8 ± 6,1	227,6 ± 5,1	297,5 ± 9,4

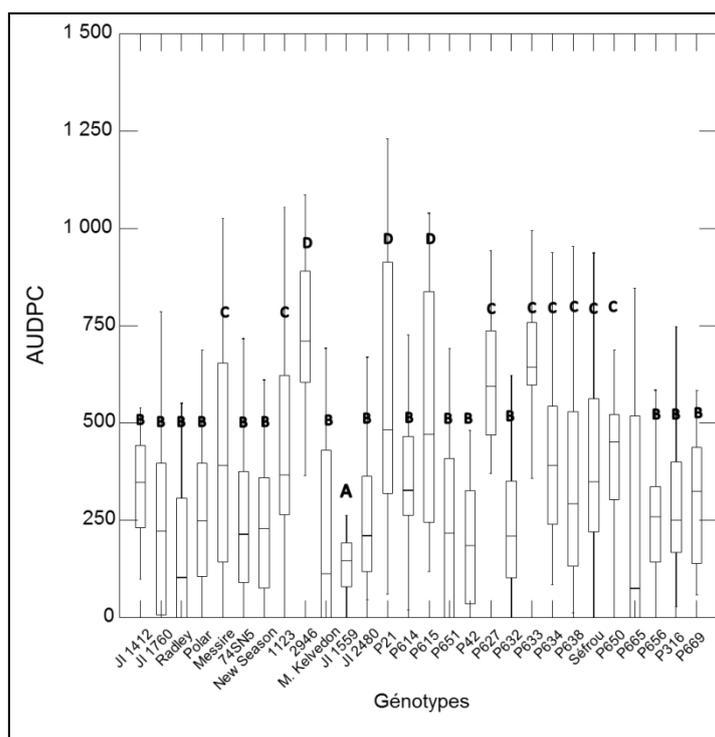


Figure 8 : Valeurs minimales et maximales d'AUDPC correspondant aux 28 géotypes étudiés.

## DISCUSSION

La fusariose vasculaire cause un ensemble de symptômes externes, incluant l'éclaircissement des nervures, l'enroulement des feuilles, le flétrissement, le jaunissement, les nécroses puis la mort de la plante [20]. L'association de ces symptômes a été signalée chez les génotypes sensibles de pois en réponse aux quatre races de Fop. Ce tableau symptomatologique peut être le résultat d'un déficit hydrique dû à l'occlusion des vaisseaux [20] ou de la combinaison des activités du pathogène, telles que la condensation du mycélium dans les cellules du xylème et/ou la production de toxines [18]. En plus des symptômes foliaires, la souche R2F42 a induit une décoloration au niveau des racines et collets des génotypes sensibles. Selon Kraft et Pflieger [5] et Kraft *et al.* [16], cette décoloration vasculaire progresse de la racine vers la tige et elle est généralement plus intense en réponse à la race 2 du champignon. Les différentes méthodes d'évaluation de la maladie utilisées dans ce travail, nous ont permis de distinguer les réponses des 28 génotypes face aux quatre souches de Fop. La résistance ou la susceptibilité d'un génotype donné est relative à la souche de Fop utilisée. C'est le cas par exemple du génotype Merveille de Kelvedon qui a enregistré une valeur effective d'AUDPC de 584,52 avec la souche R1, alors qu'il a enregistré une valeur de 36,64 avec la souche Arg1. Cette variabilité envers les différentes souches du même pathogène peut être la conséquence d'une spécificité du biotype pathogène vis-à-vis des différents cultivars de la même espèce hôte [21]. Quant aux deux génotypes localement cultivés en Algérie, Merveille de Kelvedon a montré un niveau de résistance très important envers les trois souches appartenant à la race 2 du pathogène (R2F42, Arg1 et Arg3), tandis qu'il est partiellement résistant à la race 1 représentée par la souche R1. Pour le génotype Séfrou, il a montré une résistance partielle envers les deux souches R1 et R2F42, alors qu'il est résistant aux deux souches Arg1 et Arg3. Selon les travaux de Neumann et Xue, les génotypes de pois peuvent être classés selon leurs VIS enregistrés. On peut distinguer 3 types comportements différents : les génotypes qui présentent des valeurs de VIS entre 1 et 3 sont considérés comme résistants, tandis que les génotypes qui présentent des valeurs entre 3 et 4 sont classés comme partiellement résistants et les valeurs dépassant le niveau 4 sont considérés comme susceptibles [17].

L'étude menée par Bani *et al.* a révélé une variabilité des réponses de 73 accessions de *Pisum* spp. face à la souche R2F42 de Fop, qui varient entre résistance et susceptibilité, en incluant des résistances partielles. Une telle variabilité de réponses suggère que la résistance de la collection étudiée de *Pisum* spp. à cette souche est de nature quantitative. Comme résultat de cette étude, 11 nouvelles sources de résistance ont été identifiées et confirmées, qui peuvent être utiles dans des programmes d'amélioration [13]. La résistance aux quatre races de Fop est contrôlée par des gènes héréditaires et dominants. La résistance à la race 1 est contrôlée par un seul gène dominant (*Fw*) qui est intégré dans la plupart des variétés cultivées [22]. La résistance à la race 2 est aussi conférée par un gène dominant *Fwn* [5], bien qu'il a été démontré que plusieurs gènes peuvent être impliqués [7]. La résistance à la race 5 est contrôlée par le gène dominant *Fwf* [23, 24]. Les gènes de résistance à la race 2 n'ont pas été encore assignés à un emplacement chromosomique [25]. En exprimant ces gènes, les génotypes résistants peuvent activer plusieurs mécanismes de défense tels que la production de callose [26], la synthèse des phénols estérifiés dans la paroi cellulaire [27] et l'accumulation de la pisatine [28]. Parmi les quatre souches utilisées de Fop, R2F42 s'avère la plus virulente en enregistrant des valeurs du taux d'infection, de VIS et d'AUDPC les plus importantes, suivie par la souche R1 puis les deux souches Arg1 et Arg3. Une étude sur la pathogénicité de 5 souches de Fop (incluant les deux souches R2F42 et Arg3), a révélé le rôle majeur des toxines, notamment l'acide fusarique et l'acide 9,10- déhydrofusarique, dans la pathogénicité et la virulence de Fop [29].

## CONCLUSION

Le suivi symptomatologique et le calcul des paramètres d'évaluation de la fusariose vasculaire nous a permis de différencier le comportement de 28 génotypes de pois vis-à-vis de quatre souches de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. Les réponses de ces génotypes varient entre résistance, résistance partielle et sensibilité, ce qui révèle la nature quantitative de la résistance du *Pisum* spp. face à cet agent phytopathogène. Les génotypes ayant montré des niveaux importants de résistance (Radley, Polar, 74SN5, New Season, Merveille de Kelvedon, JI1559, P42 et P656), peuvent être intégrés dans des programmes de croisement et d'amélioration, pour mieux les exploiter comme sources de résistance.

Cependant, ça sera avantageux de poursuivre les études sur ces génotypes afin de caractériser les mécanismes responsables de la résistance/tolérance à Fop de manière à favoriser les mécanismes les plus durables. Il est aussi nécessaire de continuer la caractérisation des populations locales de Fop et d'approfondir les recherches sur les mécanismes pouvant différencier la virulence de ce pathogène. Finalement, il sera intéressant aussi d'étudier le comportement de ces mêmes génotypes vis-à-vis d'autres maladies et stress abiotiques, pour une exploitation durable et intégrée.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. FAOSTAT (2019). <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC>.
- [2]. Zohary D. and Hopf M., (2000). Domestication of Plants in the Old World. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford University Press, New York, p. 316.
- [3]. Weiss E. and Zohary D. (2011). The Neolithic southwest Asian founder crops. *Curr. Anthropol*, 52: S237 - S254.
- [4]. Smýkal P., Hýbl M., Corander J., Jarkovský J., Flavell A.J. and Griga M. (2008). Genetic diversity and population structure of pea (*Pisum sativum* L.) varieties derived from combined retrotransposon, microsatellite and morphological marker analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 117: 413 - 424.
- [5]. Kraft J.M. and Pflieger F.L. (2001). Compendium of Pea Diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 67p.
- [6]. Kraft J.M. (1994). Fusarium wilt of peas (a review). *Agronomie*, 14: 561 - 567.
- [7]. Infantino A., Kharrat M., Riccioni L., Coyne C.J., McPhe, K.E. and Grunwald N.J. (2006). Screening Techniques and Sources of Resistance to Root Diseases in Cool Season Food Legumes. *Euphytica*, 147: 201 - 221.
- [8]. Navas-Cortes J.A., Hau B. and Jimenez-Diaz R.M. (1998). Effect of sowing date, host cultivar, and race of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* on development of fusarium wilt of chickpea. *Phytopathology*, 88: 1338 - 1346.
- [9]. Momma N., Momma M. and Kobara Y. (2010). Biological soil disinfestation using ethanol: effect on *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and soil microorganisms. *Journal of General Plant Pathology*, 76: 336 - 344.
- [10]. Alabouvette C., Olivain C., Migheli Q. and Steinberg C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *The New Phytologist*, 184 : 529 - 544.
- [11]. Yala A., Chouih S., Rispaill N. et Benchabane M. (2018). Biocontrôle des trachéomycoses par les PGPR: cas de la fusariose du pois avec *Pseudomonas fluorescens*. *Agrobiologia*, 8 (2): 1110-1116.
- [12]. Sharma A., Rathour R., Plaha P., Katoch V., Khalsa G.S., Patial V., Singh Y. and Pathania N.K. (2010). Induction of fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*) resistance in garden pea using induced mutagenesis and in vitro selection techniques. *Euphytica*, 173: 345 - 356.
- [13]. Bani M., Rubiales D. and Rispaill N. (2012). A detailed evaluation method to identify sources of quantitative resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* race 2 within a *Pisum* spp. germplasm collection. *Plant Pathology*, 61: 532 - 542.
- [14]. Lebeda A., Švábová L. and Dostálová R. (2010). Screening of peas for resistance to fusarium wilt and root rot (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*). In: *Mass Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Diseases FAO/IAEA*, Vienna, 189 - 196.
- [15]. Haglund, W.A. (1989). A rapid method for inoculating pea seedlings with *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Plant Disease*, 73 (6): 457 - 458.
- [16]. Kraft J.M., Larsen R.C. and Inglis D.A. (1998). Diseases of pea. In: *Allen, D.J. and Lenné J.M. (Eds), The Pathology of Food and Pasture Legumes. CAB International, Wallingford, UK, 325 - 370.*
- [17]. Neumann S. and Xue A.G. (2003). Reactions of field pea cultivars to four races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Can. J. Plant Sci.*, 83: 377 - 379.
- [18]. Charchar M. and Kraft J.M. (1989). Response of near-isogenic pea cultivars to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* Races 1 and 5. *Can. J. Plant Sci.*, 69: 1335 - 1346.
- [19]. Teng P.S. and James W.C. (2002). Disease and yield loss assessment. In: *Waller, J.M., Lenné, J.M. and Waller, S.J. (eds), Plant pathologist's pocketbook 3rd ed, CAB International, Wallingford, UK, 25 - 38.*
- [20]. MacHardy W.E. and Beckman C.H. (1983). Vascular wilt fusaria: infection and pathogenesis. In: *Nelson PE, Tousson TA, Cook RJ, eds. Fusarium: Diseases, Biology*

- and Taxonomy, University Park, PA, USA: The Pennsylvania State University Press, 365 - 90.
- [21]. **Lepoivre, P. (2003)**. Les mécanismes de résistance et la spécificité parasitaire », In : *Phytopathologie, 1ère édition, De Boeck et Larcier, Bruxelles, Belgique*, 161 - 191.
- [22]. **Grajal-Martín M.J. and Muehlbauer F.J. (2002)**. Genomic location of the *Fw* gene for resistance to fusarium wilt race 1 in peas. *Journal of Heredity*, 93: 291 - 293.
- [23]. **Coyne C.J., Inglis D.A., Whitehead S.J. and Muehlbauer F.J. (2000)**. Chromosomal location of *Fwf* in pea. *Pisum Genetics*, 32: 20 - 22.
- [24]. **Okubara P.A., Inglis D.A., Muehlbauer F.J. and Coyne C.J. (2002)**. A novel RAPD marker linked to the fusarium wilt race 5 resistance gene (*Fwf*) in *Pisum sativum*. *Pisum Genetics*, 34 : 6 - 8.
- [25]. **Bani M. (2015)**. Multidisciplinary approaches including histological, biochemical and molecular tools to study the resistance mechanisms to fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* in pea (*Pisum sativum*). *PhD thesis, Department of genetics, University of Cordoba, Spain*, 187 p.
- [26]. **Beckman C.H. (2000)**. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 57: 101 - 110.
- [27]. **Vidhyasekaran P. (2008)**. Fungal Pathogenesis in Plants and Crops: Molecular Biology and Host Defense mechanisms. *CRC Press, Boca Raton*, 536p.
- [28]. **Bani M., Cimmino A., Evidente A., Rubiales D. and Rispaill N. (2018)**. Pisatin involvement in the variation of inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* spore germination by root exudates of *Pisum* spp. germplasm. *Plant pathology*, <https://doi.org/10.1111/ppa.12813>.
- [29]. **Bani M., Rispaill N., Evidente A., Rubiales D., and Cimmino A. (2014)**. Identification of the Main Toxins Isolated from *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* Race 2 and Their Relation with Isolates Pathogenicity. *J. Agric. Food Chem.*, 62: 2574 - 2580.