

UNIVERSITE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la vie

Département des Biotechnologies

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Phytopathologie

**ETUDE DU PATHOSYSTEME PISUM SATIVUM-
FUSARIUM OXYSPOURUM F. SP. PISI**

Présenté par

Delel MEKHALDI

Devant le jury composé de :

A. Boutekrabt	Professeur, U. Blida 1	Président
A. Riba	Professeur, UMBB, Boumerdes	Examineur
A. Aissat	MCA, U. Blida 1	Examineur
M. Benchabane	Professeur, U. Blida 1	Promoteur
N. Rispaïl	Docteur, Maître de recherche, IAS, CSIC, Cordoue, Espagne	Co-promoteur

Blida, Février 2016

RESUME

Etude du pathosystème *Pisum sativum*-*Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*

Notre travail porte sur l'étude du pathosystème *Pisum sativum*-*Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* afin de déterminer la stabilité de la résistance de 28 génotypes du pois, en interaction avec 4 souches de *Fop* (R1 : race 1, R2F42, Arg1 et Arg3 : race 2). L'étude a été menée dans des conditions semi-contrôlées (sous serre). Les 28 génotypes ont été inoculés selon la méthode d'immersion des racines dans les suspensions de spores. Les 4 souches ont pu induire des symptômes typiques de la fusariose vasculaire sur les plants inoculés (flétrissement, jaunissement, dessèchement et/ou mort de la plante). Le taux d'infection, le VIS (*Visual Index of Severity*) et l'AUDPC (*Area Under Disease Progress Curve*), sont les paramètres utilisés pour évaluer le développement et la progression de la maladie. Selon ces paramètres, les génotypes qui sont avérés les plus sensibles sont 2946 et P21 en enregistrant les taux d'infection (64,48% et 63,29%) et les VIS (4,41 et 4,4) les plus élevés, en interaction avec la souche R2F42. Les génotypes qui sont avérés les plus résistants sont JI 1559 et Radley en enregistrant les taux d'infection (5,42% et 12,8%) et les VIS (1,08 et 1,12) les plus faibles, en interaction avec la souche Arg3. Selon les valeurs d'AUDPC, la souche R2F42 est la plus virulente, suivie par la souche R1. Les deux souches locales Arg1 et Arg3 sont les moins virulentes.

L'étude du comportement des 28 génotypes de pois vis-à-vis de la fusariose vasculaire, dans des conditions d'infection naturelle, a été menée au niveau de la station expérimentale (Université Blida 1) en plein champ. Aucune apparition de la maladie n'a été enregistrée dont tous les génotypes ont apparu sains. Les taux de germination les plus élevés ont été notés chez les génotypes JI1760, JI2480 et P638. Le nombre de gousses le plus important a été obtenu chez le génotype P656 (67 gousses). Le génotype JI1559 a produit la biomasse la plus importante (232,76 g), tandis que le poids des graines et le poids de 100 graines les plus importants ont été notés chez le génotype JI1760 (49,97 g) et JI1559 (32,42 g), respectivement.

Une PCR (*Polymerase chain reaction*) a été menée afin de caractériser 11 isolats de *F. oxysporum*. L'amplification a révélé la similarité des produits d'amplification des régions ITS et EF α 1 à ceux de la souche de référence R2F42.

Mots clés : *Pisum* spp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*, pathosystème, fusariose vasculaire, comportement, résistance.

ABSTRACT

Study of the pathosystem *Pisum sativum*-*Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*

Our work concerns the study of the pathosystem *Pisum sativum*-*Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* in order to determinate the stability of the resistance of 28 genotypes of pea, in interaction with 4 strains of *Fop* (R1: race 1, R 2F42, Arg1 and Arg3: race 2). The study was carried under semi-controlled conditions (under greenhouse). The 28 genotypes were inoculated according to the method of immersion of the roots in the suspensions of spores. The 4 strains could induce typical symptoms of the Fusarium wilt on the inoculated seedlings (wilting, yellowing, drying and/or died of the plant). The rate of infection, the VIS (Visual Index of Severity) and the AUDPC (Area Under Disease Curve Progress), are the parameters used to evaluate the development and the progression of the disease. According to these parameters, the genotypes which are proven most sensitive are 2946 and P21 by recording the rates of infection (64,48% and 63,29%) and the VIS (4,41 and 4,4) the most raised, in interaction with the strain R2F42. The genotypes which are proven most resistant are JI 1559 and Radley by recording the rates of infection (5,42% and 12,8%) and the VIS (1,08 and 1,12) the most lowest, in interaction with the strain Arg3. According to the values of AUDPC, the strain R2F42 is the most virulent, followed by R1. The two local strains Arg1 and Arg3 are the least virulent.

The study of the behavior of the 28 pea genotypes with toward to the Fusarium wilt, under conditions of natural infection, was led in the experimental station (University of Blida 1) in full field. No appearance of the disease was recorded of which all the genotypes appeared healthy. The highest rates of germination were noted with the genotypes JI1760, JI2480 and P638. The most significant number of pods was obtained with the genotype P656 (67 pods). Genotype JI1559 produced the most important biomass (232,76 g), while the weight of seeds and the most important weight of 100 seeds were noted with genotype JI1760 (49,97 g) and JI1559 (32,42 g), respectively.

A PCR (*Polymerase chain reaction*) was carried in order to characterize 11 isolates of *F. oxysporum*. The amplification revealed the similarity of amplification's products of ITS and EF α 1 regions with these of the reference strain R2F42.

Key words: *Pisum* spp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*, pathosystem, fusarium wilt, behavior, resistance.

ملخص

دراسة النظام المرضي *Pisum sativum-Fusarium oxysporum f.sp. pisi*

يهدف عملنا إلى دراسة النظام المرضي *Pisum sativum-Fusarium oxysporum f.sp. pisi* لتحديد استقرار مقاومة 28 نمط وراثي للبالزلاء. أجري بالتفاعل مع 4 سلالات (R1: سلالة 1، R2F42، Arg1 و Arg3: سلالة 2). أجريت الدراسة في ظروف شبيهة بمراقبة (في بيت بلاستيكي). طُعمت الأنماط الوراثية حسب طريقة غمس الجذور في المعلق الفطري. استطاعت السلالات الأربعة (R1، R2F42، Arg1 و Arg3) أن تسبب ظهور أعراض نموذجية للذبول الفوزاري على النباتات المطعمة (ذبول، إصفرار، جفاف و/أو موت النبتة). نسبة الإصابة، (Visual Index of Severity) VIS و (Area Under Disease Progress AUDPC) Curve) هم المقاييس المستعملة لتقييم تطور وتقدم المرض. حسب هذه المقاييس، الأنماط الوراثية الأكثر حساسية هي 2946 و P21 مسجلة أعلى نسبة إصابة (64,48% و 63,24%) و VIS (4,4 و 4,41). بالتفاعل مع السلالة R2F42. الأنماط الوراثية الأكثر مقاومة هي JI1559 و Radley مسجلة أضعف نسبة إصابة (5,42% و 12,8%) و VIS (1,08 و 1,12)، بالتفاعل مع السلالة Arg3. حسب قيم AUDPC، السلالة R2F42 هي الأكثر شراسة، متبوعة بالسلالة R1. السلالتان المحليتان Arg1 و Arg3 كانتا الأقل شراسة.

دراسة سلوك 28 نمط وراثي للبالزلاء تجاه الذبول الفوزاري في ظروف إصابة طبيعية، قد أجري على مستوى المحطة التجريبية (جامعة البليدة 1). لم نسجل أي ظهور للمرض حيث أن مختلف الأنماط الوراثية بدت سليمة. سجلت أعلى نسبة إنتاش لدى JI1760، JI2480 و P638. سجل أكبر عدد من الثمار لدى النمط الوراثي P656 (67 ثمرة). أنتج النمط الوراثي JI1559 أكبر كتلة حيوية (232,76 غ)، في حين أن أعلى وزن للذبول و أعلى وزن 100 بذرة قد سجلوا لدى النمطين الوراثيين JI1760 (49,97 غ) و JI1559 (32,42 غ)، على التوالي.

كشفت التمييز الجزيئي لـ 11 عزلة لـ *F. oxysporum* على تشابه منتجات تضاعف المنطقتين الكروموزوميتين ITS و EFa1 مقارنة مع السلالة المرجعية R2F42.

الكلمات المفتاحية : *Pisum spp.* ، *Fusarium oxysporum f.sp. pisi*. نظام مرضي، ذبول فوزاري، سلوك، مقاومة.

REMERCIEMENTS

Mes très vifs remerciements s'adressent à mon promoteur **Pr. Benchabane M.** qui m'a énormément aidé tout au long de mon travail. Qu'il trouve ici mes sincères reconnaissances pour sa disponibilité, son inestimable aide et ses très précieux conseils.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à mon co-promoteur **Dr. Nicolas Rispail** pour le temps consenti pour suivre mon travail et pour ses précieuses remarques et orientations qui ont bien enrichi le mémoire.

Ma plus sincère gratitude à **Pr. Boutekrabt A.** qui a gracieusement accepté de présider le jury. Que Messieurs les professeurs **Aissat A.** et **Riba A.** trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté de participer à l'examen de ce mémoire et pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.

Un merci très spécial à l'ingénieur de laboratoire de mycologie, **Fadil Djamilia**, qui m'a appris tous les principes de manipulation des champignons. Merci beaucoup Djamilia pour ta disponibilité et pour tes précieux conseils. Je remercie aussi tout le personnel des laboratoires de zoologie, de phytopharmacie, de virologie et de microbiologie.

Je tiens à remercier **Dr. Bani Moustafa** pour son inestimable aide et sa disponibilité durant mon séjour à Cordoue.

Un très grand merci s'adresse à ma chère **Fatima Zohra Kessoum**, qui m'a énormément aidé dans toutes les étapes et parties de mon travail de serre et de plein champ. Qu'elle trouve ici mes profondes reconnaissances. Je tiens à remercier aussi mes chères amies **Heddane Razika** et **Boukaya Nassira** pour leur inestimable aide et pour tous les moments inoubliables, « je vous aime énormément ».

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.

Dédicaces

A mon cher Papa,

A ma chère Mama,

(Maigres récompenses pour l'immense effort et sacrifice. Que Dieu vous protège et vous garde),

A mes chers frères Aissam, Chems-Eddine, Ayoub et Zakaria,

A ma chère sœur Sanaa,

A mes poussins Meriem, Nour, Manar, Darine, Abd-Essamad et Dania,

je dédie ce travail.

TABLE DES MATIERES

RESUME

ABSTRACT

ملخص

REMERCIEMENTS

DEDICACES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAU

INTRODUCTION.....	11
1. CHAPITRE 1 : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	13
1.1. Généralités sur le pois	13
1.1.1. Origine et taxonomie	13
1.1.2. Biologie de la plante.....	14
1.1.3. Principaux types de cultures et intérêt agro-alimentaire	15
1.1.4. Ressources génétiques et amélioration	16
1.1.4.1. Ressources génétiques	16
1.1.4.2. Sélection et amélioration	17
1.1.5. Facteurs limitant la production	19
1.1.5.1. Stress abiotiques	19
1.1.5.2. Stress biotiques	19
1.1.5.2.1. Ravageurs et parasites.....	19
1.1.5.2.2. Principales maladies bactériennes et virales	20
1.1.5.2.3. Principales maladies fongiques	20
1.2. La fusariose vasculaire du pois.....	21
1.2.1. Généralités sur <i>Fusarium oxysporum</i>	21
1.2.2. Caractéristiques morphologiques.....	22
1.2.3. Processus d'infection	23
1.2.4. Mécanismes parasitaires	25
1.2.4.1. Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire	25
1.2.4.2. Production de toxines	26
1.2.4.3. Autres mécanismes	26
1.2.5. Mécanismes de défense de la plante.....	26

1.2.6. Races de <i>Fop</i>	28
1.2.7. Symptômes de la maladie.....	29
1.2.8. Epidémiologie	30
1.2.9. Contrôle de la maladie	31
1.2.9.1. Lutte culturale	31
1.2.9.2. Lutte chimique	31
1.2.9.3. Lutte biologique	31
1.2.9.4. Lutte génétique.....	32
2. CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	33
2.1. Matériel végétal.....	33
2.2. Isolats fongiques	34
2.3. Expérimentation sous serre	34
2.3.1. Prégermination des graines	34
2.3.2. Préparation de l'inoculum.....	35
2.3.3. Inoculation des plantules.....	35
2.3.4. Dispositif expérimental	35
2.3.5. Paramètres étudiés	37
2.3.5.1. Suivi symptomatologique.....	37
2.3.5.2. Taux d'infection.....	37
2.3.5.3. Sévérité de la maladie (VIS)	37
2.3.5.4. Courbe des aires de progression de la maladie (AUDPC).....	38
2.4. Expérimentation en plein champ.....	39
2.4.1. Semis et dispositif expérimental.....	39
2.4.2. Paramètres étudiés	41
2.5. Caractérisation moléculaire des isolats.....	41
2.5.1. Extraction de l'ADN	41
2.5.2. Amplification des fragments par PCR	42
2.6. Analyses statistiques.....	43
3. CHAPITRE 3 : RESULTATS.....	44
3.1. Expérimentation sous serre	44
3.1.1. Description symptomatologique	44

3.1.2. VIS et taux d'infection	48
3.1.3. Courbe des aires de progression de la maladie (AUDPC)	52
3.2. Expérimentation en plein champ	56
3.2.1. Taux de germination	56
3.2.2. Dates de floraison	57
3.2.3. Taux d'infection	58
3.2.4. Nombre de plantes et gousses	59
3.2.5. Biomasse et poids des graines	60
3.3. Caractérisation moléculaire des isolats de <i>Fusarium oxysporum</i>	61
4. CHAPITRE 4 : DISCUSSION	64
4.1. Expression symptomatologique	64
4.2. Paramètres d'évaluation de la maladie	65
4.3. Relation hôte-pathogène.....	67
4.4. Comportement des génotypes du pois en plein champ	67
4.5. Caractérisation moléculaire des isolats.....	69
CONCLUSION	70
APPENDICES	73
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	88

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Collections du matériel génétique du pois.	17
Figure 1.2	Caractéristiques morphologiques de <i>F. oxysporum</i> .	23
Figure 1.3	Cycle infectieux de <i>F. oxysporum</i> .	24
Figure 1.4	Symptômes de la fusariose vasculaire du pois.	30
Figure 2.1	Echelle de l'évaluation des symptômes de la fusariose vasculaire.	38
Figure 2.2	Dispositif expérimental de l'expérimentation en plein champ.	40
Figure 2.3	Programme d'amplification sélectionné pour la PCR.	43
Figure 3.1	Progression des symptômes de la fusariose vasculaire chez le génotype Séfrou inoculé avec la souche R1.	44
Figure 3.2	Progression des symptômes de la fusariose vasculaire chez le génotype Messire inoculé avec la souche R2F42.	45
Figure 3.3	Aspect des racines du génotype P632, 31 jours après l'inoculation avec les quatre souches de <i>Fop</i> .	46
Figure 3.4	Symptômes internes chez le génotype Messire 31 jours après l'inoculation avec les quatre souches de <i>Fop</i> (G: x8).	47
Figure 3.5	Valeurs effectives de VIS des 28 génotypes de pois 31 jours après leur inoculation avec les quatre souches de <i>Fop</i> .	49
Figure 3.6	Valeurs VIS des 28 génotypes du pois en interaction avec les quatre souches de <i>Fop</i> 31 jours après l'inoculation.	50
Figure 3.7	Evolution des valeurs VIS des génotypes 74SN5, 2946, P651, Merveille de Kelvedon et P21 inoculés avec les quatre souches de <i>Fop</i> .	51
Figure 3.8	Valeurs d'AUDPC des 28 génotypes de pois inoculés avec les quatre souches de <i>Fop</i> .	52
Figure 3.9	Valeurs minimales et maximales d'AUDPC correspondant aux 28 génotypes étudiés de pois (test PPds).	54
Figure 3.10	valeurs minimales et maximales d'AUDPC correspondant aux quatre souches de <i>Fop</i> (test PPds).	55

Figure 3.11	Taux de germination des 28 géotypes de petit pois en plein champ.	56
Figure 3.12	Dates de floraison des 28 géotypes de petit pois en plein champ.	57
Figure 3.13	Développement des géotypes dans des conditions de plein champ.	58
Figure 3.14	Absence de décoloration des vaisseaux conducteurs chez les géotypes étudiés en plein champ.	59
Figure 3.15	Nombre de plantes et gousses produites par les 28 géotypes étudiés en plein champ.	59
Figure 3.16	Biomasse produites par les 28 géotypes étudiés du pois en plein champ.	60
Figure 3.17	Poids des graines produites par les 28 géotypes étudiés du pois en plein champ.	61
Figure 3.18	Profil électrophorèse de la migration des ADN des 11 isolats fongiques.	61
Figure 3.19	Profil d'amplification des régions EF α 1 et ITS des ADN des 11 isolats fongiques.	63
Tableau 2.1	Géotypes du pois étudiés.	33
Tableau 2.2	Les différents traitements du dispositif expérimental.	36
Tableau 2.3	Composition du mélange pour PCR (pour un tube).	42
Tableau 2.4	Amorces utilisées dans la PCR.	43
Tableau 3.1	Concentration en ADN des échantillons d'extraction des 11 isolats fongiques étudiés.	62

INTRODUCTION

Les légumineuses alimentaires sont considérées parmi les cultures les plus importantes dans le monde, notamment dans la plupart des pays du bassin méditerranéen. Elles offrent un apport en protéines végétales pour l'alimentation humaine et animale et constituent un excellent précédent cultural dans les systèmes de production céréalière. Le pois (*Pisum sativum* L.) couramment appelé «petits pois», est considéré comme la deuxième légumineuse la plus cultivée dans le monde [1], 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 [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].

En 2013, le rendement mondial moyen du pois était estimé à 1,72 tonnes/ha. Les principaux pays producteurs de pois frais et sec sont le Canada (35%), la Russie (12%), et la Chine (13%) [5]. En Algérie, la culture du pois frais s'étendait sur 32 641 hectares, avec une production de 127 680 tonnes. En Afrique du nord, l'Algérie est classée en troisième position après le Maroc et la Tunisie, dont les espèces de légumineuses alimentaires les plus cultivées sont la lentille, le pois chiche, la fève, le haricot et le pois (*Pisum sativum* L) [6].

Les légumineuses sont susceptibles aux stress abiotiques, tels que le déficit hydrique et la salinité du sol. La sécheresse est le principal facteur abiotique limitant la production. Dans les pays méditerranéens, le déficit hydrique est produit non seulement dans les régions arides et semi-arides, mais également dans les régions où la précipitation est importante mais pas uniformément distribuée pendant la période de végétation. En outre, les maladies sont parmi les causes les plus importantes qui réduisent les rendements des semences et de la biomasse du pois [7, 8].

L'interaction entre les stress abiotiques et biotiques peut provoquer des effets dévastateurs sur les récoltes. 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 [9]. Ce pathogène tellurique peut survivre sous forme de chlamydospores, qui restent viables dans le sol pendant plus de 10 ans [10]. *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 [11]. De plus, *Fop* évolue continuellement, avec l'émergence de nouvelles variantes du pathogène [9]. Le contrôle de cette maladie 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 [12, 13, 14, 15, 16].

Parmi ces méthodes, l'utilisation de cultivars résistants est l'approche la plus adéquate [17]. Une étude récente a identifié différentes sources de résistance quantitative face à une souche de la race 2 de *Fop* dans une collection de *Pisum* spp. [16]. Ces nouvelles sources de résistance sont des candidats intéressants pour introduire la résistance à *Fop* dans les cultivars. Cependant, avant de pouvoir être utilisées dans les programmes d'amélioration des plantes, leurs niveaux de résistances à *Fop* doivent être confirmés en condition de plein champ et face à différentes souches phytopathogènes.

Ainsi, dans le cadre du projet de Coopération du CSIC 2014CD0011 du programme I-COOP-AGROFOOD 2014 et en collaboration avec le groupe d'amélioration de la résistance des plantes de l'Institut de l'Agriculture Durable de Cordoue (IAS, CSIC - Espagne), notre travail consiste à étudier le pathosystème *Pisum sativum*-*Fop*, dont nous avons suivi les objectifs suivants:

- Déterminer la stabilité de la résistance à *Fop* d'une collection de génotypes face à quatre souches phytopathogènes de *Fop* en conditions semi-contrôlées sous serre.
- Valider les niveaux de résistance à *Fop* de ces génotypes en condition d'infection naturelle en plein champ.

CHAPITRE 1

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. Généralités sur le pois

1.1.1. Origine et taxonomie

Diverses découvertes archéologiques indiquent que la culture du pois s'est initiée durant la préhistoire. SMARTT (1990) dans son livre « *Légumineuses à graines: évolution et ressources génétiques* », a indiqué que les pois remontent à 7000-6000 ans avant Jésus Christ [18]. ERSKINE *et al.*, (1994) ont mentionné que les pois bien que rares à l'emplacement néolithique de Jarmo, Irak (6750 ans avant Jésus Christ), étaient très répandus à celui d'Erbaba en Turquie (5800-5400 ans avant Jésus Christ) [19]. En Europe, les plus anciennes traces de pois découvertes dans les excavations d'Aggetelek en Hongrie et aussi en Suisse datant de l'âge de pierre [20]. Par ailleurs, les pois exhumés des logements dans le lac Bourget en France sont supposés dater de l'âge du bronze, (1000-2000 ans avant Jésus Christ) [21]. THEOPHRASTUS (1961), dans son livre « Enquête sur les plantes » traduit en anglais, 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 [22].

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.

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 de pois furent donc initialement décrites par les botanistes pour différencier ces plantes suivant leurs caractéristiques morphologiques comme par exemple *Pisum*

formosum, *P. transcaasicum*, *P. abyssinicum*, *P. aethiopicum*, *P. arvense* et *P. sativum* qui est l'espèce la plus répandue [20]. Les études postérieures combinant les caractères morphologiques et génétiques regroupèrent ces espèces en trois espèces principales: *P. abyssinicum*, *P. fulvum* et *P. sativum*. Cette dernière est divisée en sous-espèces, telles que *P. sativum* ssp. *sativum*, *P. sativum* ssp. *elatius*, *P. sativum* ssp. *humile*, *P. sativum* ssp. *arvense*, *P. sativum* ssp. *transcaasicum* et *P. sativum* ssp. *hortense* [23].

Pisum sativum ssp. *arvense* inclut le pois fourrager caractérisé par des fleurs colorées et des graines pigmentées. L'espèce *P. abyssinicum* cultivée en Ethiopie et au Yémen et présente aussi à l'état sauvage en Ethiopie, pourrait avoir évolué d'une façon indépendante avec des contributions du matériel génétique de *P. fulvum* et de *P. sativum* ssp. *elatius*. Tous les taxons de *Pisum* sont diploïdes ($2n=14$) et la majorité sont inter-croisables et produisent des hybrides viables [24].

1.1.2. Biologie de la plante

La fleur du pois est typique de la famille de *Papilionaceae*. La corolle contient cinq pétales : deux ailes et une quille formée comme résultat de la fusion de deux pétales entourant dix anthères et un style [25]. Le pois est cléistogame et doit être considéré en tant qu'espèce strictement auto-fertile, bien que *Xylocopa* (le xylocope ou abeille charpentière) et *Megachile* (le mégachile ou abeille solitaire) fréquentent les fleurs de pois et puissent être responsables des hybridations normales. Ainsi, le mélange génétique peut avoir lieu sans intervention des sélectionneurs. Les populations normales et les variétés se composent des plantes génétiquement stables [25].

Toutes les variétés cultivées de pois sont des lignées pures. Afin d'obtenir des variétés hybrides, il serait nécessaire de trouver des mutants avec des fleurs ouvertes, une source mâle-stérile et un porteur efficace de pollen. La production de graine artificielle pourrait également être considérée après la micropropagation des graines hybrides. Mais, en raison de la complexité de ces techniques qu'il reste encore à prouver leur rentabilité, il semble probable que les variétés lignées pures continueront à être employées [25].

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 de laquelle les gousses se développent. Le nombre de graines par gousse dépend de la variété et des conditions environnementales [25].

1.1.3. Principaux types de cultures et intérêt agro-alimentaire

La culture du pois a besoin d'un climat relativement frais. Les températures moyennes doivent être comprises entre 7 et 24°C. 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 [26]. Le cycle végétatif du pois est d'environ 140 jours pour les variétés de printemps, pouvant descendre à 90 jours pour les variétés ultra-précoces et remonte jusque 240 jours pour les variétés d'hiver [27].

Plus de 1000 variétés de pois ont été recensées dans le monde entier [25]. Les graines de pois sont riches en protéine (23-25%), en amidon (50%), en sucres solubles (5%), en fibre, en minéraux et en vitamines [28]. Le pois, comme d'autres légumineuses, accumule également des substances naturelles (métabolites secondaires), comme les isoflavonoides qui sont considérés bénéfiques à la santé humaine grâce à leur pouvoir anticancéreux et d'autres activités promotrices de la santé [29]. Pour ces raisons, le pois possède plusieurs usages finaux dont les feuilles, les gousses vertes, la graine non mûre (verte) et la graine mûre sèche peuvent être utilisées comme nourriture humaine ou alimentation animale [30, 26]. 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 comme en Asie, les jeunes pousses feuillées sont aussi consommées. Dans le cas de l'alimentation animale, la plante entière fraîche ou ensilée sèche est utilisée

comme fourrages pour les ruminants. En général, les pois dits « fourrager » incluent tout type de pois destiné à l'alimentation animale, y compris les pois secs en grains qui sont aussi appelés pois protéagineux [30, 26].

1.1.4. Ressources génétiques et amélioration du pois

1.1.4.1. Ressources génétiques

La diversité génétique du pois est préservée dans des collections de matériel génétique, avec plus de 1000 entrées trouvées dans des banques nationales de gènes dans au moins 25 pays, avec plusieurs autres petites collections dans le monde entier contenant 98 mille entrées [31].

Dans certaines collections, des matériels sauvages et localement adaptés doivent être rassemblés avant que ces ressources génétiques soient perdues. De nombreuses études ont été conduites pour étudier la diversité et les marqueurs du matériel génétique de *Pisum*. Plusieurs collections importantes de matériel génétique du pois ont été analysées par des méthodes moléculaires et des collections fondamentales ont été formées [32]. 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 [31].

Dans le cas des espèces sauvages de *Pisum*, il y a seulement 706 accessions de *P. fulvum*, 624 de *P. sativum* ssp. *elatius*, 1562 de *P. sativum* ssp. *sativum* et 540 accessions de *P. abyssinicum*, qui sont préservées *ex situ* dans les collections (Figure 1.1). Lors des récapitulations des données sur l'origine géographique, il y a une grande polarisation (17%) vers des accessions occidentales et de l'Europe centrale car ces régions représentent des activités actuelles d'amélioration de pois par rapport aux régions méditerranéennes (2.5%), aux régions balkaniques (2%), à la Caucase (0.8%) et à l'Asie centrale (2%) [31].

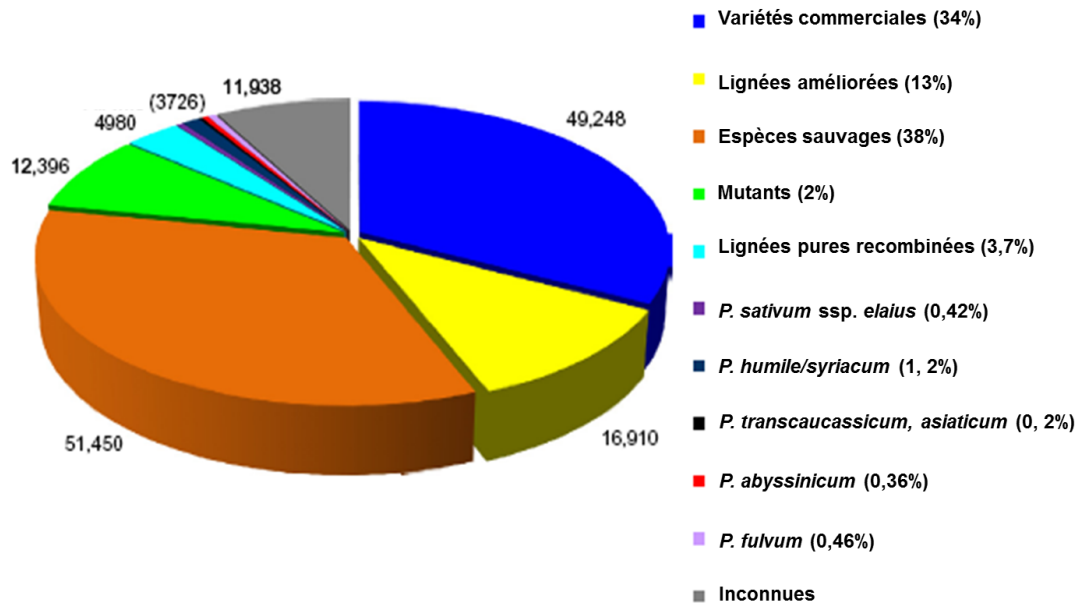


Figure 1.1 : Collections du matériel génétique du pois [31].

1.1.4.2. Sélection et amélioration génétique

Le pois est l'organisme modèle original utilisé par Mendel dans sa découverte des lois fondamentales de l'hérédité (1866), et qui constitue la base de la génétique végétale moderne [8]. La facilité de sa culture, sa reproduction par autopolinisation et sa richesse en variation génétique ont fait du pois un sujet facile pour la recherche et l'amélioration génétique [33]. 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 [7].

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 [24, 33]. 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 [34]. 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 [35].

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 [33, 7]. D'autre part, la résistance génétique partielle, associée aux mécanismes de la résistance quantitative ont été décrits pour plusieurs agents phytopathogènes, telles que *Mycosphaerella pinodes* [36], *Uromyces pisi* [37], *Phoma medicaginis* var. *pinodella*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* [38], *Fusarium oxysporum* [16] et *Orobanche crenata* [36].

Plusieurs programmes d'amélioration ont visé la caractérisation des QTLs (*Quantitative Trait Locus*), responsables à la résistance aux champignons phytopathogènes et aux mauvaises herbes dans des 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 [24]. *P. fulvum* est la seule espèce sauvage distincte, qui a été une source utile de résistance aux maladies et aux insectes [24, 39]. 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 [34, 40].

1.1.5. Facteurs limitant la production

Les rendements potentiels de la majorité des productions agricoles sont généralement réduits à cause des contraintes environnementales et biotiques [7].

1.1.5.1. Stress abiotiques

Le froid, la sécheresse et les déficits nutritionnels sont les stress environnementaux les plus importants pouvant affecter la production de 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 [25]. La sécheresse est le deuxième stress abiotique le plus important pour le pois. L'aridité et les températures élevées apparaissent ensemble dans plusieurs régions de production de légumineuses, dont les deux types de stress peuvent interagir pour réduire les rendements [7]. De plus, la sécheresse peut arrêter la fixation de l'azote et diminuer la production de biomasse [25]. En outre, la salinité est aussi un stress important du pois. Des niveaux critiques du sel ont été établis et des procédures de dépistage ont été 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 [41].

1.1.5.2. Stress biotiques

1.1.5.2.1. 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 [24]. Selon CLEMENT *et al.*, 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 [42].

Orobanche crenata, espèce 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 [43].

Le pois est également affecté par un certain nombre de nématodes tels que *Pratylenchus* spp., *Meloidogyne* spp. et *Heterodera goettingiana*, auxquels peu de résistance est disponible [7].

1.1.5.2.2. 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* [25].

Les maladies virales sont dommageables dans la plupart des régions du monde où les pois sont cultivés [24]. Il y a plus de 50 virus connus pouvant infecter le pois [9]. Le plus important parmi eux est le virus de la mosaïque du pois (PSbMV : *Pea Seed borne Mosaic Virus*) qui a été disséminé dans le monde entier par les graines infectées [44, 25]. La maladie s'est également transmise par les pucerons [9]. Le pois peut également être affecté par d'autres virus, tels que le virus de l'enroulement des feuilles du pois (PLRV : *Potato Leaf Roll Virus*), le virus de la mosaïque et d'énation de 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 de pois (PCMV : *Pea Commun Mosaic Virus*) et le virus de brunissement précoce de pois [25].

1.1.5.2.3. Principales maladies fongiques

La variation du rendement du pois est souvent associée à des attaques fongiques. Les maladies à craindre sur les récoltes sont surtout celles qui se manifestent par des attaques foliaires et racinaires.

La croissance du pois est sujette à diverses maladies fongiques foliaires. 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 un problème dans des zones douces et humides [24].

L'oïdium du pois causé par *Erysiphe pisi*, est une maladie foliaire très répandue dans le monde [45]. Elle peut causer des dégâts graves si elle se produit tôt dans la saison, avant la floraison. Elle est plus importante dans les régions subtropicales et dans les régions tempérées [9]. La résistance à l'oïdium est exprimée par un gène récessif (*er1*) [46 ; 47]. La rouille du pois est causée par le champignon *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 [48]. 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 [48, 24].

Les maladies telluriques sont considérées comme un facteur principal limitant l'augmentation et la stabilisation des rendements du pois [10]. Parmi ces maladies, la pourriture racinaire causée par *Fusarium solani* f. sp. *psii* et la fusariose vasculaire causée par *F. oxysporum* f. sp. *psii* (*Fop*), sont les parasites les plus importants. La fusariose vasculaire provoquée par *Fop* a été rapportée dans tous les pays où les pois sont cultivés et peut être particulièrement grave lorsque des rotations courtes des cultures sont pratiquées [9].

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 [50]. En 2013, la base de données *Fusarium-ID* a énuméré 76 espèces distinctes de *Fusarium* basées sur le séquençage du gène codant le facteur 1 alpha (EF-1 α) de la traduction et de l'élongation [51].

Fusarium est considéré comme l'un des genres les plus adaptables et les plus maniabiles des *Eumycota*. L'une des espèces les plus importantes est *Fusarium oxysporum* qui est composée de souches pathogènes et non pathogènes [52]. *F. oxysporum* est un champignon d'origine tellurique cosmopolite, qui présente une

très grande diversité génétique et écologique. Cette espèce inclut plus d'une centaine de formes spéciales et races qui sont chacune spécifique à une plante hôte, souvent des espèces végétales d'intérêt horticole, maraîcher ou agronomique. *F. oxysporum* inclut également des populations non pathogènes pour lesquelles aucune plante hôte n'a été identifiée à ce jour [53, 54].

Les espèces phytopathogènes de *F. oxysporum* causent des maladies importantes sur les cultures, en induisant spécialement le flétrissement vasculaire [55]. Cette maladie attaque plusieurs plantes pérennes et annuelles, aussi bien dans les zones tempérées que dans les zones tropicales causant leur jaunissement et leur flétrissement [56]. Le haut niveau de spécificité des souches pathogènes de *F. oxysporum* a conduit à la détermination des formes spéciales (*formae specialis*, f. sp.) ce qui permet la différenciation de ces souches morphologiquement similaires [57]. Chaque forme spéciale peut être divisée en races physiologiques et chaque race physiologique montre un modèle caractéristique de virulence sur des variétés différentielles dans la même espèce hôte [58, 59].

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 ce qui la place dans le groupe des Deutéromycètes [60]. Ainsi, *F. oxysporum* est un Deutéromycète tellurique appartenant à la sous classe des Hyphomycètes et à la famille des Tuberculariacées [61, 62, 63].

1.2.2. Caractéristiques morphologiques

F. oxysporum est une espèce anamorphe caractérisée par une série de 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 a été estimée entre 18,1 et 51,5 Mb, avec un nombre de chromosomes variant de 7 à 14 incluant les plasmides mitochondriaux linéaires [64]. 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) (Figure 1.2) et sur des caractéristiques culturelles (texture de colonie, couleur et arôme de la

culture) [50]. Ainsi, *F. oxysporum* est caractérisé 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 chlamydozoospores à paroi lisse ou rugueuse formées séparément ou en paires (Figure 1.1) [50].

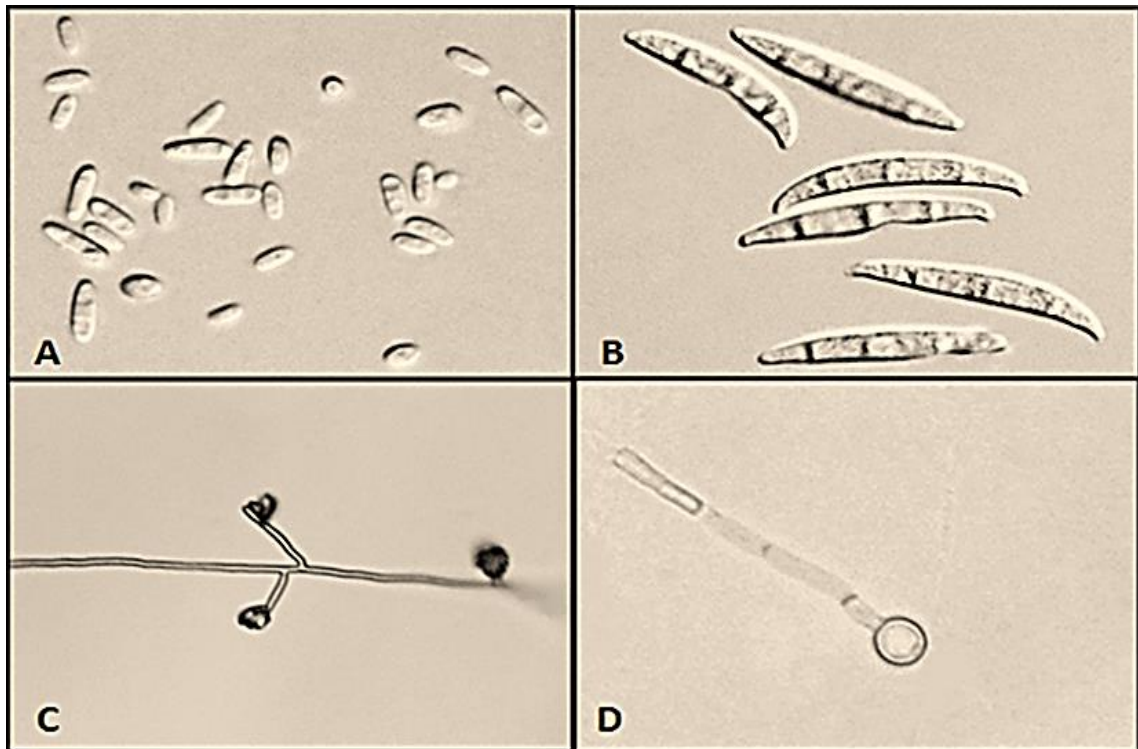


Figure 1.2 : Caractéristiques morphologiques de *F. oxysporum* [50].

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

1.2.3. Processus d'infection

F. oxysporum peut survivre dans le sol pendant des périodes prolongées sous forme de chlamydozoospores d'où il est difficile à l'éliminer une fois que le sol est infesté [58]. Les chlamydozoospores dormantes de *F. oxysporum* présentes dans le sol germent sous des conditions favorables et infectent les plantes à travers leurs racines [51]. Après la germination, un thalle va être formé à partir duquel des conidies se forment dans 6 à 7 heures, et des chlamydozoospores dans 2 à 3 jours si les conditions sont favorable [65].

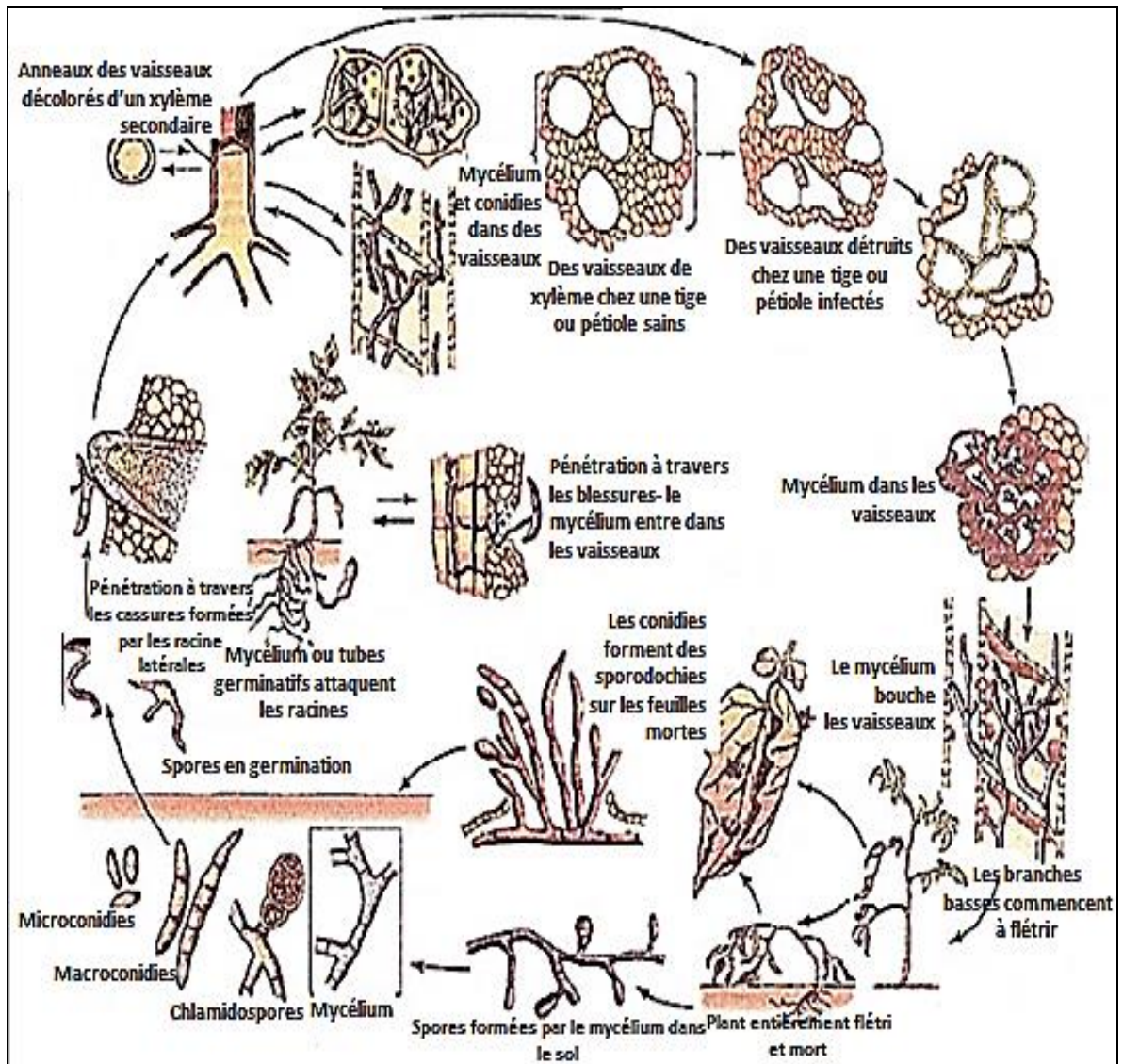


Figure 1.3 : Cycle infectieux de *F. oxysporum* [58].

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 [51].

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. L'entrée dans les vaisseaux du xylème se produit à travers des creux, et le champignon se modifie à une phase vasculaire distincte où il demeure confiné dans les vaisseaux du xylème. A ce stade, le champignon prolifère dans le xylème, s'infiltré par la production de microconidies qui migrent vers le haut avec le flux de la sève [51].

Les symptômes caractéristiques de la fusariose vasculaire apparaissent à cause du fort stress hydrique provoqué par la prolifération fongique, combinée avec des réactions de défense de l'hôte. Aux stades avancés de l'infection, quand la plante est morte, le champignon passe du mode biotrophe au mode nécrotrophe, en envahissant le parenchyme de l'hôte et en sporulant d'une façon abondante (production des grandes quantités de conidies et de chlamydospores) [51]. Le pathogène survit sur les débris des plantes infectées dans le sol sous forme de mycélium et sous toutes ses formes de spores, mais le plus souvent sous forme de chlamydospores dans les régions tempérées plus fraîches [58].

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*, l'absence de structures spécialisées, telles que les appressoriums a toujours été un facteur important liant la pénétration à la sécrétion des enzymes de dégradation de la paroi végétale (CWDEs : *Cell Wall Degrading Enzymes*). Plusieurs enzymes, telles que 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* [51].

1.2.4.2. Production de toxines

Fusarium spp. sont connus depuis longtemps pour produire des métabolites secondaires toxiques pour les plantes (les phytotoxines). L'acide fusarique, un composé caractérisé par une toxicité modérée pour les plantes, a été l'un des premiers métabolites fongiques impliqués dans la pathogénèse [66]. Cette toxine non spécifique est produite par plusieurs espèces de *Fusarium* [67]. 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 [68]. Bien que la relation entre l'acide fusarique et la pathogénèse est encore en débat, il a été décrit comme le facteur responsable de la pathogénicité de la race 2 de *Fop* [69]. 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 à leur pathogénicité [70].

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 récemment les protéines effectrices sont des mécanismes qui sont impliqués dans le processus d'infection des plantes par *F. oxysporum* [56, 71]. Le gène *fmk1* codant pour une MAPK et sa cible principale le facteur de transcription *Ste12* a été isolé chez *F. oxysporum* [72, 73]. Il a été démontré que 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 [72, 73].

1.2.5. Mécanismes de défense de la plante

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) [74]. 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 du champignon, 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 [75].

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 du champignon [76, 58].

La réponse hypersensible produite par la mort des cellules parenchymateuses des tissus vasculaires infectés par le champignon a également été observée sur des racines de plantes infectées par *F. oxysporum* [77]. 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 [78, 75].

La production de composés antifongiques est également une stratégie de base de défense chez la plante [79]. Elle comprend la production et l'accumulation de composés antimicrobiens, appelés phytoanticipines et phytoalexines, dans le site d'infection [80]. Des peptides antimicrobiens et des espèces réactives d'oxygène peuvent être aussi produits lors d'une infection parasitaire [81, 82]. Une protéine antifongique ayant une masse moléculaire de 31kDa, a été isolée chez la variété macrocarpon de *Pisum sativum*. La protéine, appelée pisumine, a montré une activité antifongique envers *F. oxysporum* et *Rhizoctonia solani* [83]. Une autre protéine antifongique ayant une masse moléculaire de 11 kDa, a été

aussi isolée à partir des graines de *Pisum sativum* var. *arvense* Poir, qui a montré son activité inhibitrice envers *F. oxysporum* [84].

Chez la plupart des plantes, les gènes conférant une résistance dominante envers les pathogènes, codent des protéines impliquées dans la reconnaissance spécifique de la race du pathogène. La relation gène pour gène accorde à une forte résistance codée par les gènes *R*, envers les pathogènes qui expriment des gènes d'avirulence (*avr*) correspondants [85]. Les gènes *R* codent deux catégories de protéines riches en leucine (LRR : *Leucine-Rich-Repeat*) menées d'un site de perception du pathogène [86]. 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 [85, 87].

En contraste avec la forte résistance codée par un seul gène *R*, la résistance de l'hôte et souvent oligogénique, reportée à une résistance horizontale, est identifiée par des locus multiples à traits quantitatifs (QTL : *Quantitative Trait Loci*) [88]. Les deux types de résistance monogénique et oligogénique envers *F. oxysporum*, ont été décrites chez plusieurs espèces végétales [89, 65].

1.2.6. Races de *Fop*

La fusariose vasculaire du pois a été décrite la première fois et distinguée de la pourriture racinaire par JONES et LINFORD (1925) qui l'ont appelée « la maladie du flétrissement méconnu ». À ce moment, la maladie a été signalée dans 50 parcelles à Wisconsin aux Etats-Unis, où elle a causé des pertes économiques plus importantes que celles rapportées pour la pourriture racinaire [90]. L'agent causal a été appelé *F. othoceras* var. *pisi* [91].

Le pathogène a été dénommé plus tard race 1 de *F. oxysporum* f. sp. *pisi* en 1935 [92]. 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 la race 2 [93]. Cette nouvelle race apparaît plus tard dans la période de végétation, souvent seulement durant le développement des gousses [94]. Les races 3 et 4 ont été ensuite décrites aux Pays Bas et au Canada, respectivement [10]. 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 l'état de Washington (Etats Unis) [95], où tous les cultivars commerciaux connus résistants aux races 1 et 2, étaient susceptibles. En 1979, une nouvelle race de *Fop* a été décrite à l'ouest de l'état de Washington, qui était pathogène sur des cultivars et des lignées améliorées résistants aux races 1, 2 et 5, et a été dénommée la race 6 [96]. A l'heure actuelle, quatre races de *Fop* ont été 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 l'état de Washington aux Etats-Unis [11].

1.2.7. 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 des tiges deviennent plus fragiles. Bien que le système racinaire apparaisse normal, le tissu vasculaire de la racine et de la tige peut devenir jaune à orange. Cette décoloration vasculaire s'étend souvent à la tige supérieure (Figure 1.4 B). Durant le développement de la maladie, le jaunissement progresse des feuilles inférieures vers l'apex de la tige (Figure 1.4 A). La fusariose se développe rapidement entraînant la mort des plantes [97].

Les symptômes de la race 2 sur les plantes individuelles sont semblables aux symptômes d'autres races de *Fop*. Cependant, les symptômes de plein champ consistent seulement à des plantes présentant des symptômes occasionnels sauf si le niveau d'inoculum est extrêmement élevé. Les symptômes de la race 2 se produisent habituellement plus tard en pleine croissance, souvent à la floraison. La décoloration vasculaire causée par la race 2 est généralement plus intense que les autres races allant de l'orange au rouge foncé [9].

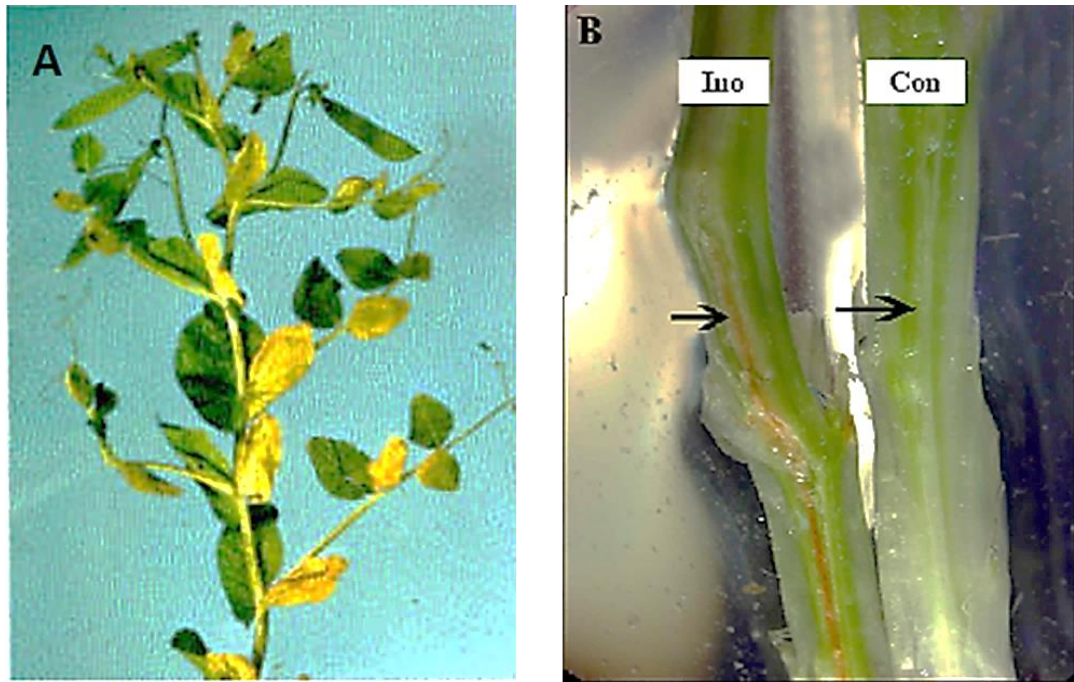


Figure 1.4 : Symptômes de la fusariose vasculaire du pois [97, 98].

(A) jaunissement unilatéral des feuilles, (B) Coloration des tissus vasculaires.

1.2.8. 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 d'un champ à un autre par les outils agricoles et les débris végétaux. Il peut également être dispersé par le vent ou par les eaux d'irrigation [9]. Une fois introduit dans un nouveau champ, le champignon a besoin d'abord d'augmenter son nombre dans le milieu. Une période de latence de quelques années se produit avant que le champignon atteigne la quantité suffisante d'inoculum pour causer la maladie [9].

Une température du sol de 21 à 25° C est généralement plus favorable pour que *Fop* puisse causer la maladie, bien que la race 5 peut infecter les plantes hôtes à des basses températures [99, 9].

1.2.9. Contrôle de la maladie

Le contrôle des agents phytopathogènes est principalement basé sur trois stratégies : les pratiques culturales, l'application des produits agrochimiques et l'utilisation de variétés résistantes [100].

1.2.9.1. Lutte culturale

La rotation des cultures est la meilleure pratique culturale qui peut contribuer à la réduction des dégâts causés par les phytopathogènes fongiques. Cependant, la rotation des cultures n'a qu'un effet 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 [101].

1.2.9.2. Lutte chimique

La fumigation du sol avec un fongicide à large spectre est une méthode de lutte potentielle qui fournit un bon contrôle préventif, bien que la recolonisation du sol par *Fop* se déroule très rapidement [101]. En outre, la fumigation des sols est coûteuse pour l'application aux champs et en raison de l'impact négatif des produits chimiques sur les organismes non cibles et le potentiel de risque pour l'environnement et la santé, la gamme et le taux de fongicides utilisée a été progressivement limitée et certains d'entre eux ont été éliminés, tels que le bromure de méthyle [102].

1.2.9.3. Lutte biologique

Durant ces dernières années, le contrôle biologique de la fusariose vasculaire a donné des résultats encourageants. Le biocontrôle consiste à utiliser des champignons antagonistes tels que les souches non pathogènes de *F. oxysporum*, *Trichoderma* spp. et *Gliocladium* spp., et des bactéries telles que *Pseudomonas fluorescens* et *Burkholderia cepacia* [103, 104, 105]. Bien que promettant, aucun de ces microorganismes n'a été utilisé pour contrôler la fusariose en pratique jusqu'à présent [97].

1.2.9.4. Lutte génétique

L'utilisation des variétés résistantes du pois a été considérée comme la seule 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 [106]. La résistance à la race 2 est aussi conférée par un gène dominant *Fwn* [9], bien qu'il a été démontré que plusieurs gènes peuvent être impliqués [11]. 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" [107, 108]. Les gènes de résistance à la race 2 n'ont pas été encore assignés à un emplacement chromosomique et le gène de résistance à la race 2 n'a pas été encore déterminé [97].

La résistance horizontale a été identifiée, mais elle reste incomplète. Donc, quand le potentiel de la maladie est élevé, les cultivars meurent ou se mûrissent précocement que les plantes indemnes de maladie, ce qui cause une perte de rendement et de la qualité de congélation ou la mise en conserve des graines de pois [94, 9].

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

Une collection de 28 génotypes issus de populations spontanées et de variétés fourragères de *Pisum* spp. a été utilisée. Les génotypes appartiennent aux deux espèces *P. fulvum* et *P. sativum* dont cette dernière renferme plusieurs sous-espèces à savoir *sativum*, *arvense*, *elatius*, *jormadi* et *syriacum*. Les semences de 26 génotypes ont été issues de l'Institut de l'Agriculture Durable de Cordoue (*IAS-CSIC, Cordoba, Spain*). Alors que les semences des deux autres génotypes Séfrou et Merveille de Kelvedon, cultivés localement, ont été fournies par l'Institut Technique des Grandes Cultures de Sétif (ITGC, Sétif) (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Génotypes du pois étudiés.

Génotypes	Espèces
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 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>

2.2. Isolats fongiques

Pour déterminer les niveaux de résistance de la collection de pois et sa stabilité sous serre, quatre souches de *Fop* R1, R2F42, Arg1 et Arg3, fournies par l'IAS-CSIC, ont été utilisées. La souche R1 appartient à la race 1, alors que les souches R2F42, Arg1 et Arg3 sont de la race 2 [69].

D'autres parts, onze nouveaux isolats de *Fusarium oxysporum* ont été caractérisés au niveau moléculaire. Ces isolats, M121A, M121B, M121C, M1, M2, M3, AF31, M211, M233A, M233B et AF23, ont été antérieurement isolés à l'IAS-CSIC à partir de plants de pois porteurs de symptômes évidents de la fusariose vasculaire, dans des régions de Mascara et de Ain Fares (Relizane).

Afin de les régénérer, les souches et les isolats ont été ensemencés sur le milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*) et incubées à 28 °C pendant quatre à cinq jours. Pour obtenir le mycélium, un disque de chaque culture produite sur le PDA a été transféré dans 100 ml de PDB (*Potato Dextrose Broth*) et cultivé à 28 °C sous agitation constante (170 rpm) pendant 4 jours. Une fois multiplié, le milieu de culture a été filtré sur deux compresses stériles pour récupérer le mycélium frais qui a été congelé dans de l'azote liquide et gardé à -80 °C jusqu'à son utilisation pour extraire son ADN.

2.3. Expérimentation sous serre

2.3.1. 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. Cinquante graines de chaque génotype sont par la suite enveloppées dans un papier filtre stérilisé et humecté 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 ont été incubées à 25 °C jusqu'à la germination des graines. Une fois germées, les graines ont été transférées dans des pots de 250 ml de volume contenant de la

perlite stérile et maintenues sous serre en verre. Les plantules sont arrosées avec de l'eau courante selon le besoin.

2.3.2. Préparation de l'inoculum

Selon la technique décrite par DI PIETRO et RONCERO (1998), 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 à raison de 5 à 6 disques par flacon et incubés à la température ambiante, sous agitation continue (170 rpm). Après 5 jours, les spores ont été récupérées par filtration de la suspension à travers les mailles de 2 compresses stériles [109]. A l'aide d'une cellule de Malassez, la concentration des filtrats a été mesurée puis ajustée à 5×10^6 spores/ml [110].

2.3.3. Inoculation des plantules

Pour procéder à l'inoculation des plantes avec les souches de *Fop*, nous avons utilisé la technique d'immersion des racines [110]. Au stade 2 à 3 nœuds, les plantes ont été dépotées et les racines ont été 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 à la température ambiante. Après l'inoculation, les plantes de pois ont été transplantées dans leurs pots et incubées sous serre jusqu'à la fin de l'expérimentation.

2.3.4. Dispositif expérimental

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

- Le facteur « génotype » est composé de 28 niveaux correspondant aux 28 génotypes de pois étudiés (Tableau 3.1).
- Le facteur « souche » comprend 5 niveaux correspondant aux quatre souches et aux témoins pour lesquels la suspension de *Fop* a été remplacée par de l'eau distillée stérile (EDS) lors de l'inoculation.

Le nombre total des traitements était 140 (Tableau 2.2) et chaque traitement a été répété 6 fois, soit un total de 840 plantes (unités expérimentales). Les traitements ont été randomisés dans 2 blocs aléatoires complets à raison de 3 répétitions par bloc.

Tableau 2.2 : Les différents traitements du dispositif expérimental.

Génotypes étudiés	Souches de <i>Fop</i>			Témoins	
	R1	R2F42	Arg1	Arg3	EDS
JI 1412	T1	T29	T57	T85	T113
JI 1760	T2	T30	T58	T86	T114
JI 1559	T3	T31	T59	T87	T115
JI 2480	T3	T32	T60	T88	T116
Radley	T5	T33	T61	T89	T117
Polar	T6	T34	T62	T90	T118
Messire	T7	T35	T63	T91	T119
74SN5	T8	T36	T64	T92	T120
New Season	T9	T37	T65	T93	T121
1123	T10	T38	T66	T94	T122
2946	T11	T39	T67	T95	T123
P21	T12	T40	T68	T96	T124
P42	T13	T41	T69	T97	T125
P316	T14	T42	T70	T98	T126
P614	T15	T43	T71	T99	T127
P615	T16	T44	T72	T100	T128
P627	T17	T45	T73	T101	T129
P632	T18	T46	T74	T102	T130
P633	T19	T47	T75	T103	T131
P634	T20	T48	T76	T104	T132
P638	T21	T49	T77	T105	T133
P650	T22	T50	T78	T106	T134
P651	T23	T51	T79	T107	T135
P656	T24	T52	T80	T108	T136
P665	T25	T53	T81	T109	T137
P669	T26	T54	T82	T110	T138
Séfrou	T27	T55	T83	T111	T139
M. Kelvedon	T28	T56	T84	T112	T140

2.3.5. Paramètres étudiés

2.3.5.1. 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 [16].

Une coloration rougeâtre des tissus de la tige et du collet de la plante a été précédemment décrite pour être associée aux infections par *F. oxysporum* [9]. Afin d'observer ces symptômes internes, nous avons examiné des coupes des plantes inoculées par les quatre souches de *Fop*, sous une loupe binoculaire (G : x8). Pour cela, les plantes inoculées ont été dépotées 30 jours après l'inoculation puis lavées sous l'eau du robinet. La tige et la partie supérieure du système racinaire ont été longitudinalement coupées, à l'aide d'un scalpel et observées sous une loupe binoculaire.

2.3.5.2. Taux d'infection

Pour chaque plante, nous avons calculé le taux d'infection, représenté par la proportion de feuilles symptomatiques par rapport au nombre total de feuilles.

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

Le calcul des valeurs effectives des taux d'infection pour chaque plante a été réalisé comparativement aux témoins sains traités par l'eau distillée stérile.

2.3.5.3. Sévérité de la maladie (VIS)

L'évaluation des symptômes foliaires de chaque plante a été effectuée selon une échelle visuelle de 5 niveaux [16], permettant de calculer l'indice de la sévérité (VIS : *Visual Index of Severity*) (Figure 2.1).

L'indice final est représenté par la moyenne des valeurs VIS de l'ensemble des feuilles de chaque plant.

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

Le calcul des valeurs effectives des VIS pour chaque plante a été réalisé comparativement aux témoins traités par l'eau distillée stérile.

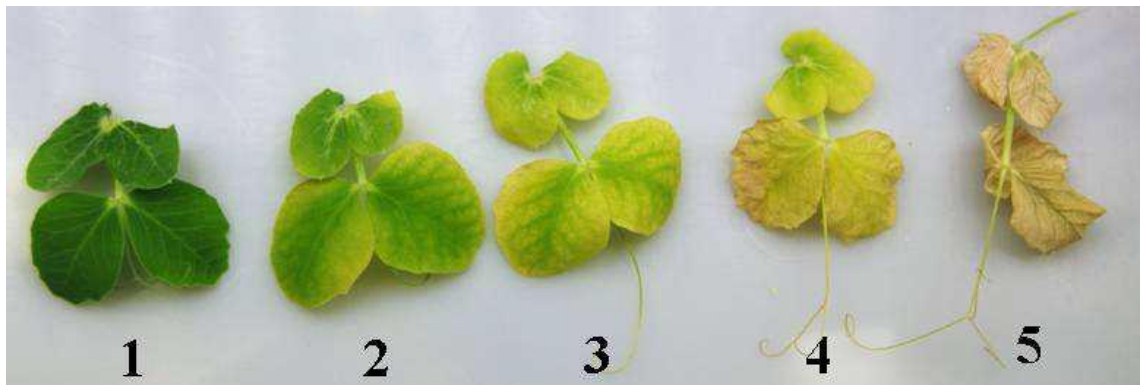


Figure 2.1 : Echelle de l'évaluation des symptômes de la fusariose vasculaire [16].

- (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.

2.3.5.4. Courbe des aires de progression de la maladie (AUDPC)

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

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

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.

2.4. Expérimentation en plein champ

2.4.1. Semis et dispositif expérimental

L'expérimentation en plein champs consiste à étudier le comportement des 28 génotypes étudiés de pois (Tableau 3.1), dans des conditions naturelles. Le travail a été réalisé au niveau de la station expérimental du Département des Biotechnologies (Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie – Université de Blida1).

Des prélèvements de sol ont été précédemment réalisés, et des analyses ont été effectuées au niveau de l'ITAFV de Boufarik (Institut Technique des Arbres Fruitières et de la Vigne). Le sol est considéré comme sableux limoneux, équilibré en matière organique et d'un pH de 7,30 (Appendice F).

L'espace expérimental (20 x 13 m) a été délimité au niveau d'une parcelle, cultivée durant les deux dernières années consécutives avec l'association avoine-trèfle suivie d'une culture de fève. Avant l'installation de notre expérimentation, le sol a subi un labour profond suivi d'un discage. Comme la culture a été conduite dans des conditions naturelles, ses besoins en eau sont assurés par les pluies (Appendice D). Durant les périodes très sèches (mi-Mars- Mai), des apports en eau ont été réalisés par rigoles.

Le semis a été réalisé dans des unités élémentaires (sillons) d'un mètre de longueur contenant 20 graines de chaque génotype étudié. L'espace entre les sillons est de 0,7 m, et de 0,5-0,7 m entre chaque file de sillon. Le cultivar local Séfrou considéré susceptible à *Fop* a été utilisé comme contrôle et semé entre les

génotypes étudiés. Chaque génotype a été répété 3 fois dans trois blocs indépendants séparés par trois sillons du génotype contrôle Séfrou (Figure 2.2).

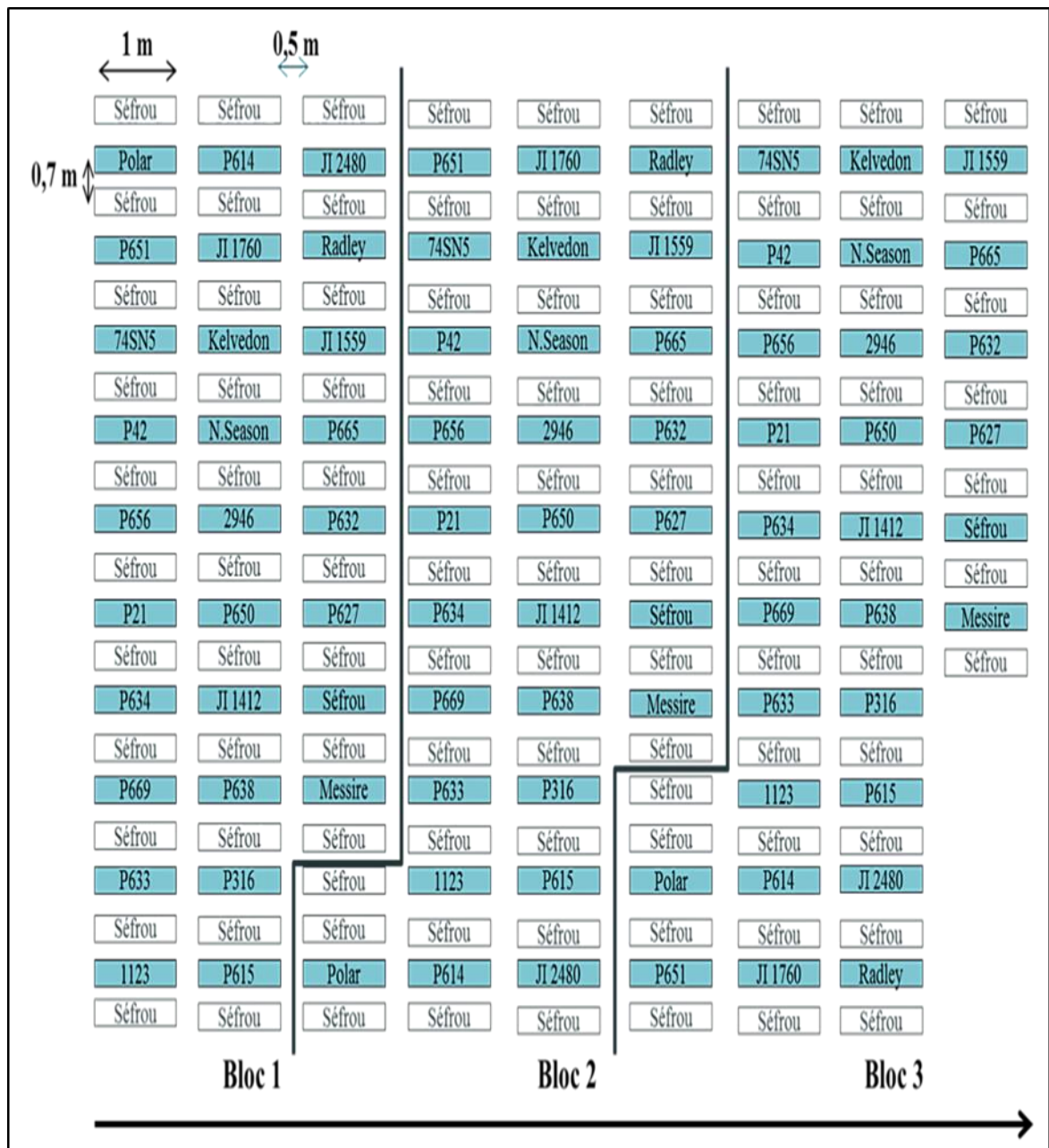


Figure 2.2 : Dispositif expérimental de l'expérimentation en plein champ.

2.4.2. Paramètres étudiés

Notre suivi se base essentiellement sur l'évaluation du comportement des 28 génotypes étudiés vis-à-vis de la fusariose vasculaire de pois. Par conséquent, nous avons mesuré le taux de sévérité de la fusariose vasculaire comme pour l'expérimentation sous serre.

De plus, nous avons évalué quelques paramètres agronomiques comme le taux de germination, la date de floraison, le nombre de plantes et de gousses, la biomasse produite et le poids des graines produites.

2.5. Caractérisation moléculaire des isolats

2.5.1. Extraction de l'ADN

Pour l'extraction de l'ADN fongique, le mycélium de chaque isolat préalablement congelé a été broyé sous azote liquide avec un mortier et pilon. Les échantillons d'ADN de chaque isolat ont été obtenus à partir de 100 à 200 mg du broyat suivant la méthode décrite par RAEDER et BRODA [111]. Pour cela, le broyat a été homogénéisé dans 1 ml de tampon d'extraction 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 µl de β-mercapto-ethanol et 1 ml de chloroforme:octanol (24 :1, V/V). Après centrifugation 5 min à 7 000 rpm à température ambiante, le surnageant de chaque échantillon contenant les acides nucléiques a été incubé 1 h à une température de -80°C en présence de 1 ml d'éthanol à 100% préalablement refroidi à -20°C pour précipiter l'ADN. Après incubation et une centrifugation à 3 000 rpm pendant 5 min à température ambiante, le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est lavé avec 1 ml d'éthanol froid (75%). Le culot d'ADN est ensuite séché à température ambiante et re-suspendu avec 50 µl d'eau ultra pure. Pour éliminer toute trace d'ARN, les échantillons sont ensuite traités durant 1h à 37°C avec 4 µl d'ARNase A.

Afin de contrôler la qualité de l'ADN, 1 µl de chaque échantillon a été séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,7% et en présence du tampon TAE.

En parallèle, la concentration en ADN a été déterminée par spectrophotométrie à 280 nm par un NanoDrop 1 000 (Thermo SCIENTIFIC, Etats-Unis).

2.5.2. Amplification des fragments par PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction: PCR*) a été réalisée dans un volume total de 50 µl contenant les éléments ci-dessous (Tableau 2.3).

Tableau 2.3 : Composition du mélange pour PCR (pour un tube).

Réactifs	Mix (x1)
Tampon 10x	5 µl (1x)
Mg Cl ₂ (50mM)	2,5 µl
dNTP (2mM)	5 µl (200µM)
Amorce sens (15µM)	1 µl (15 pmol)
Amorce anti-sens (15µM)	1 µl(15 pmol)
Taq polymérase (5U/µl)	1 µl (1U/50 µl)
Eau ultra pure	34,5/32-1 µl(ADN)=33,5/31

Deux régions chromosomiques ont été amplifiées chez les 11 isolats fongiques dans un thermocycleur MyCycler™ (BIO-RAD, Etats-Unis), selon le programme illustré dans la Figure 2.3 :

- La région ITS1-5.8S-ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*) de l'ADNr des isolats a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces ITS1 et ITS4 [112].
- Le facteur d'élongation alpha 1 (EFα1) a été amplifié en utilisant les amorces EF1 et EF 2 (Tableau 2.4) [113].

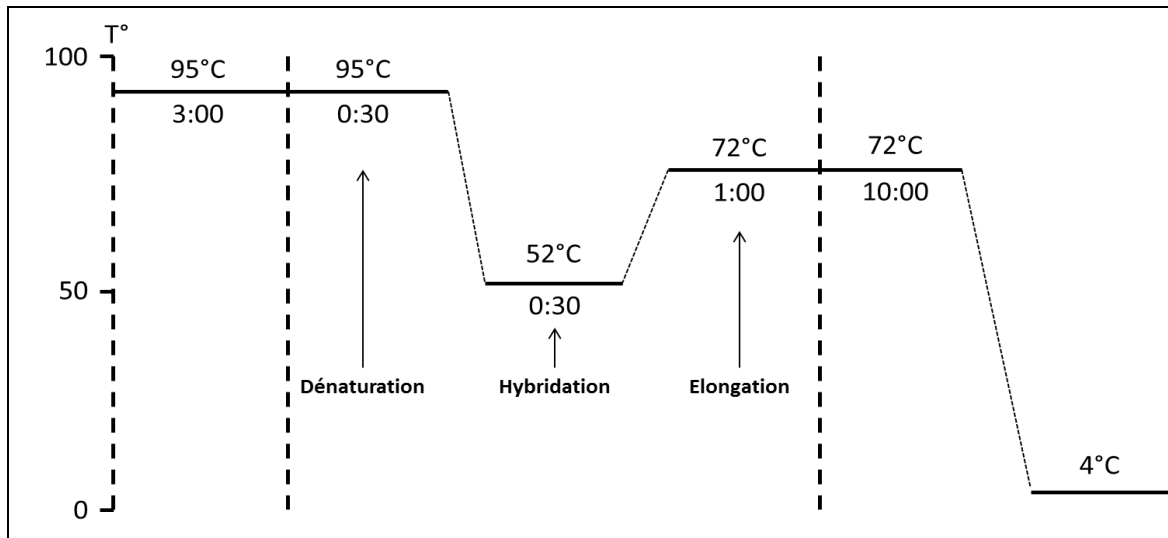


Figure 2.3: Programme d'amplification sélectionné pour la PCR.

Tableau 2.4: Amorces utilisées dans la PCR.

Locus	Nom	Amorces (sens et anti-sens)
EF1α	Facteur d'élongation	EF1, 5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3' EF2, 5'-GGARGTACCAGTSATCATG-3'
ITS	Région intergénique (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)	ITS1, 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' ITS4, 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'

A la fin de la réaction, une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7 %, a été réalisée avec 5 μ l d'amplicons et visualisée sous UV.

2.6. Analyses statistiques

Les résultats des taux d'infection, des valeurs VIS et des valeurs AUDPC de l'expérimentation sous serre, 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 de l'expérimentation sous serre a été effectué en utilisant le même logiciel, dont les différences sont significatives en se basant sur la plus petite différence au seuil $\alpha \leq 5\%$.

CHAPITRE 3

RESULTATS

3.1. Expérimentation sous serre

3.1.1. Description symptomatologique

Au niveau de la plante entière, les premiers symptômes de la fusariose vasculaire du pois, ont été détectés sur les génotypes sensibles 7 à 10 jours après l'inoculation. Les symptômes de la maladie apparaissent sur les premières feuilles (Figures 3.1 B et 3.2 B) et atteignent progressivement les jeunes feuilles jusqu'au dessèchement complet (Figure 3.2 D) et la mort de la plante entière des génotypes susceptibles comme c'est le cas du génotype Messire infecté par la souche R2F42 (Figure 3.2 E). Au niveau foliaire, les symptômes débutent par le jaunissement et/ou la courbure vers le bas des extrémités du limbe (Figures 3.1 B, 3.2 B et 3.2 C). 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 (Figures 3.1 C, 3.1 D et 3.2 D).



Figure 3.1 : 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 3.2 : 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.

En parallèle avec les symptômes au niveaux 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 (Figure 3.3). Les souches R1, Arg1 et Arg3 de *Fop* quand à elles n'ont pas causé cette

décoloration, et les racines et collet de tous les génotypes inoculés avec ces souches ont présenté une couleur normale (Figure 3.3).

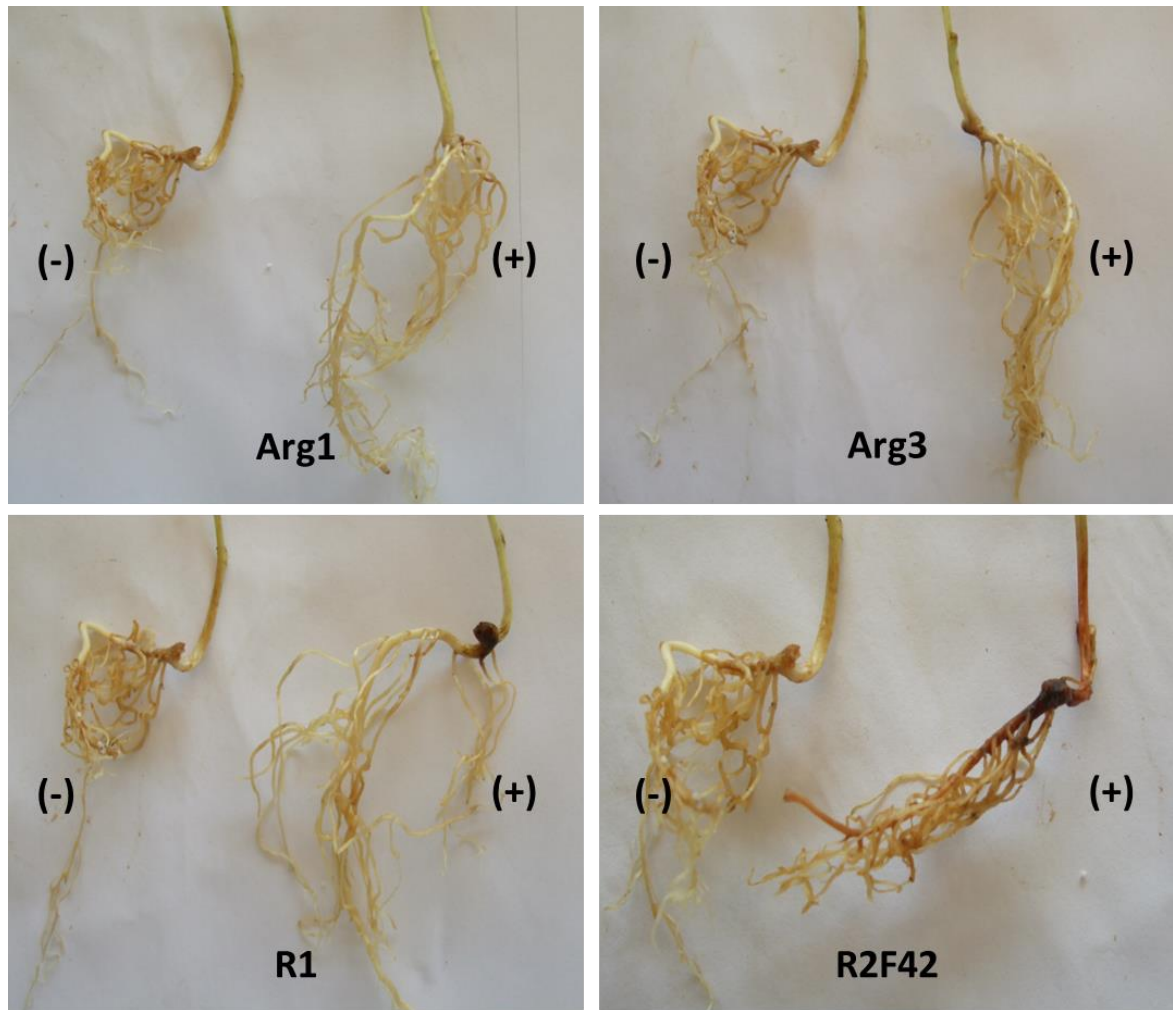


Figure 3.3: Aspect des racines du génotype P632, 31 jours après l'inoculation avec les quatre souches de *Fop*.

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

Quant aux symptômes internes, l'observation des coupes sous loupe binoculaire (G : $\times 8$), nous a montré une décoloration brune des tissus parenchymateux des différents génotypes testés (Figure 3.4). De plus, une décoloration rouge foncée du système vasculaire est visible chez les plantes inoculées par la souche R2F42 (Figure 3.4).



Figure 3.4: Symptômes internes chez le génotype Messire 31 jours après l'inoculation avec les quatre souches de *Fop* (G : x8).

3.1.2. VIS et taux d'infection

L'analyse de la variance des taux d'infection et des valeurs VIS a mis en évidence des différences significatives entre la virulence des quatre souches de *Fop* (Appendice G). La souche R2F42 a induit les taux d'infection et les valeurs VIS les plus importants (Figure 4.7 B), alors que les valeurs les plus faibles ont été enregistrées avec les deux souches Arg1 et Arg3 (Figures 4.8 A et B).

L'ANOVA a aussi mis en évidence des différences significatives entre les 28 génotypes étudiés (Appendice G). Les génotypes Messire, 2946, P21 et P634 inoculés avec la souche R2F42, ont montré les taux d'infection et les VIS les 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 K). Les valeurs VIS varient de 1,03 (P651-Arg3 : Figure 3.5 D) à 4,41 (2946-R2F42 : Figure 3.5 B).

Le génotype P627 inoculé avec la souche R1, s'est avéré le plus susceptible en présentant une valeur effective de VIS de 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 se sont avérés les moins susceptibles envers cette souche et qui ont enregistré des valeurs inférieures à 1,2 sont Radley (1,09) et P651 (1,13) (Figure 3.4 A). En interaction avec la souche R2F42, les génotypes 2946 et P21 sont avérés les plus sensibles en enregistrant des VIS supérieurs à 4. Les génotypes qui sont avérés les plus résistants sont Radley, P656, P651, JI 1559 et Merveille de Kelvedon avec des VIS inférieurs à 1,5 (Figure 3.4 B).

Tous les génotypes étudiés inoculés avec la souche Arg1, ont enregistré des valeurs VIS inférieures à 2,5, tel le cas du génotype 2946 (2,15) et le génotype P656 (1,05) (Figure 3.4 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, dont les génotypes P651, P638, JI 1559, 74SN5, Radley, JI 2480 et P632, ont enregistré les valeurs les plus faibles (Figure 3.4 D).

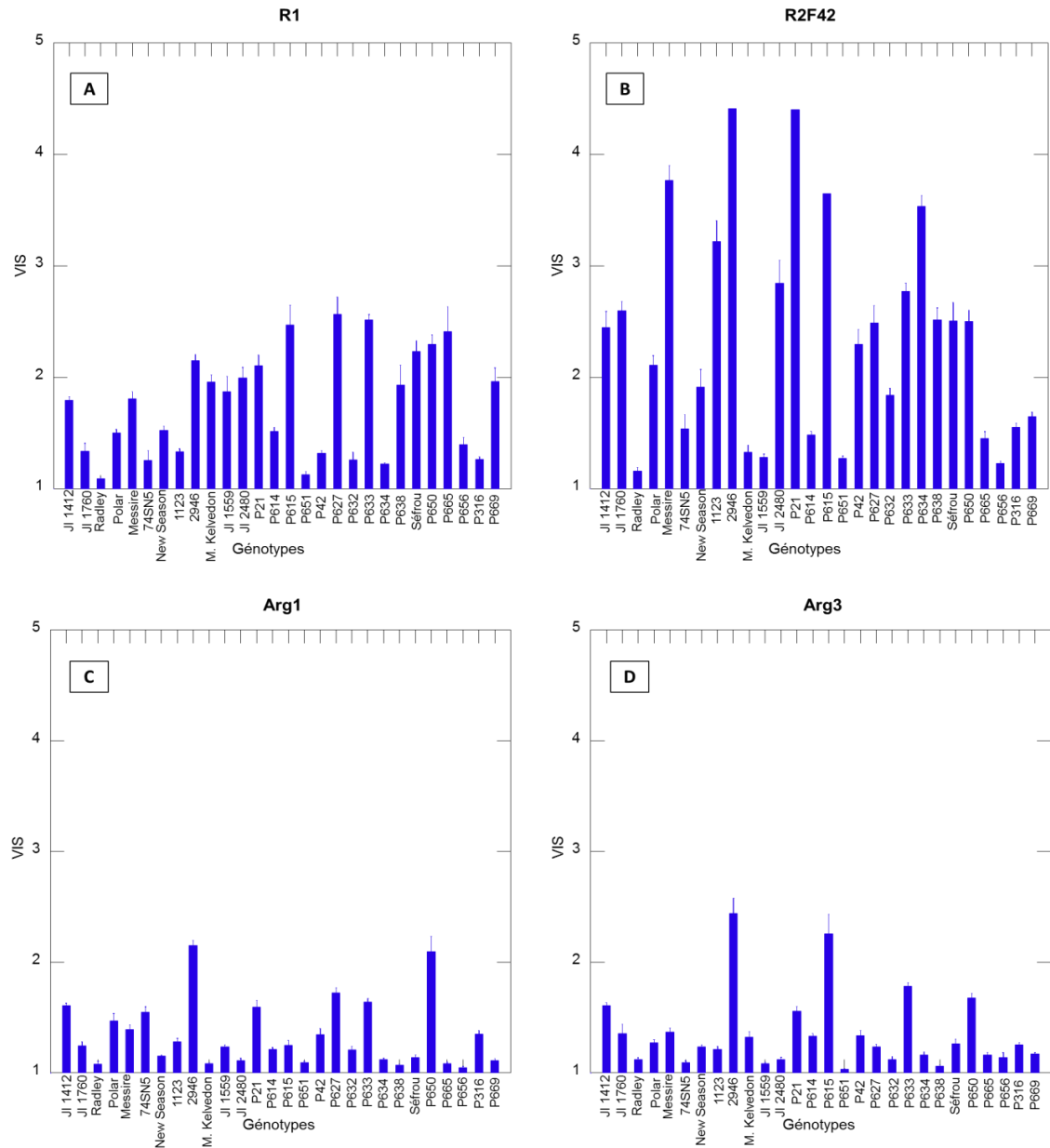


Figure 3.5: Valeurs effectives de VIS des 28 génotypes de pois 31 jours après leur inoculation avec les quatre souches de *Fop*.

La figure 3.6 représente les valeurs VIS des 28 génotypes étudiés, 31 jours après leur inoculation avec les quatre souches de *Fop*, en plus des valeurs des témoins sains (EDS).

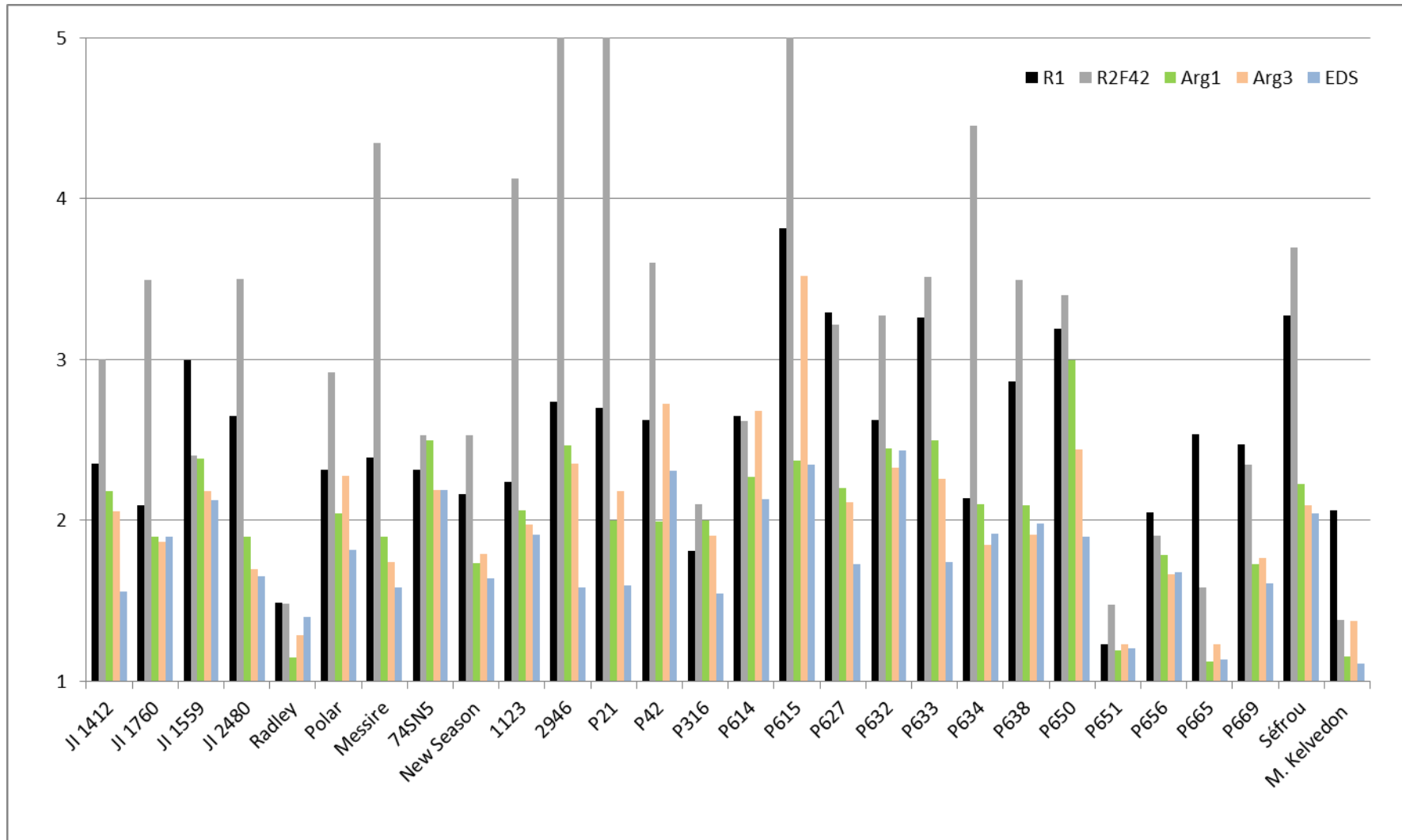


Figure 3.6 : Valeurs VIS des 28 génotypes du pois en interaction avec les quatre souches de *Fop 31* jours après l'inoculation.

De même que la progression des taux d'infection (Appendice L), 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^{ème} ou 10^{ème} jour après l'inoculation, sur la plupart des génotypes étudiés (Figure 3.7). La seule exception est le génotype Merveille de Kelvedon qui a montré un temps de latence bien plus long puisque les symptômes n'ont commencé à être visibles sur ce génotype qu'à partir du 22^{ème} jour après l'inoculation (Figure 3.7).

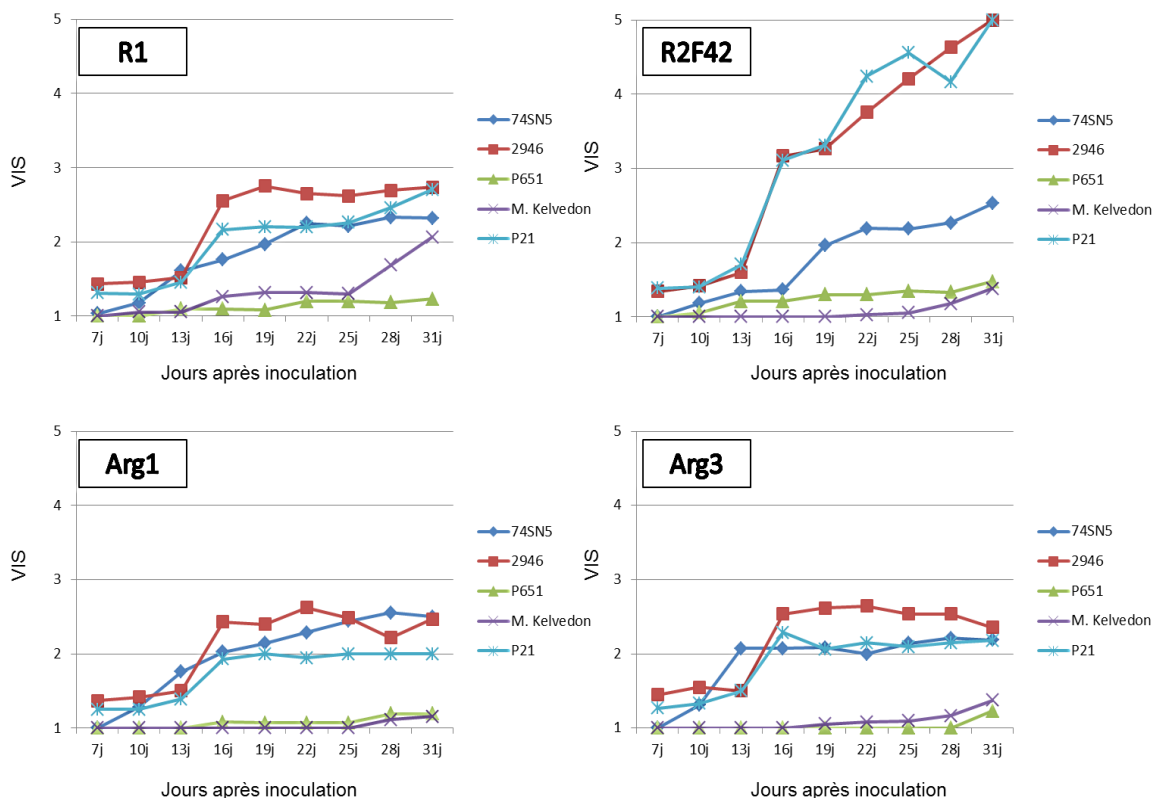


Figure 3.7: Evolution des valeurs VIS des génotypes 74SN5, 2946, P651, Merveille de Kelvedon et P21 inoculés avec les quatre souches de *Fop*.

En interaction avec les souches R1, Arg1 et Arg3, les génotypes qui sont avérés les plus susceptibles (2946 et P21), ont montré les premiers symptômes à partir du 7^{ème} jour pour atteindre des valeurs avoisinant 3, 16 jours après l'inoculation (Figure 3.7). 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 (Figure 3.7).

3.1.3. Courbe des aires de progression de la maladie (AUDPC)

L'analyse de la variance des valeurs AUDPC a mis en évidence des différences significatives entre la virulence des quatre souches de *Fop* (Appendice J). Les valeurs AUDPC les plus importantes ont été enregistrées avec la souche R2F42 (Figure 3.8 B), tandis que les valeurs les plus faibles ont été enregistrées avec les deux souches Arg1 et Arg3 (Figure 3.8 C et D).

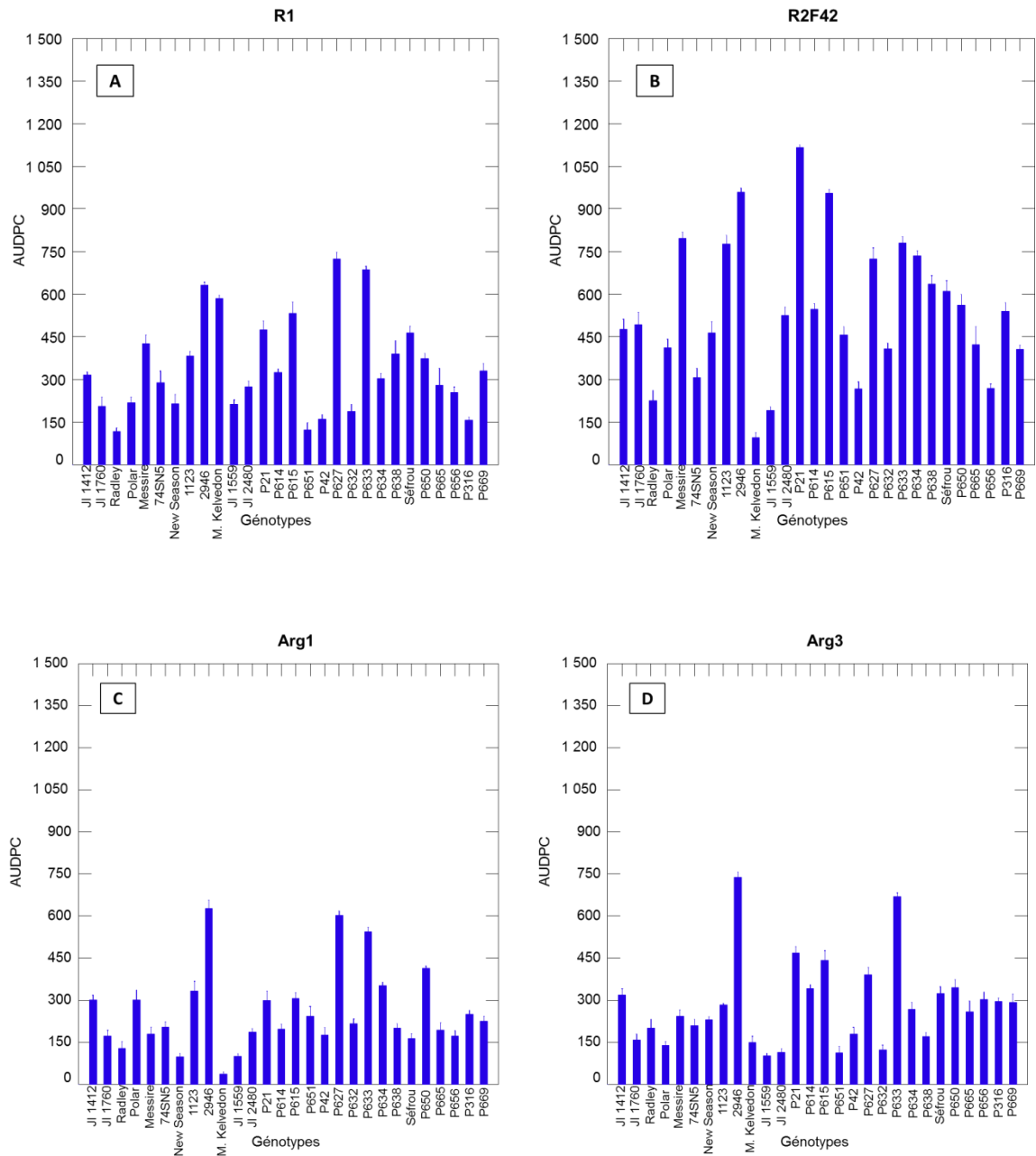


Figure 3.8: Valeurs d'AUDPC des 28 génotypes de pois inoculés avec les quatre souches de *Fop*.

L'ANOVA a mis en évidence aussi des différences significatives entre les réactions des 28 génotypes inoculés (Appendice J). Les valeurs AUDPC les plus importantes sont enregistrées chez les génotypes P21, 2946 et P615 inoculés avec la souche R2F42 (Figure 3.8 B), alors que les valeurs les plus faibles sont notées chez les génotypes JI 1559 et Merveille de Kelvedon inoculés avec les souches Arg1 et Arg3 (Figure 3.8 C et D). Les valeurs ont été comprises entre 36,64 (Merveille de Kelvedon-Arg3 : Figure 3.8 D) et 1115,87 (P21-R2F42 : Figure 3.8 B).

En interaction avec la souche R1, les AUDPC les plus importants ont été enregistrés chez les génotypes P627, P633 et 2946 avec des valeurs dépassant 600, tandis que les plus faibles ont été enregistrés chez les génotypes Radley et P651 avec des valeurs ne dépassant pas 150 (Figure 3.8 A). En interaction avec la souche R2F42, les génotypes P21, 2946 et P615 sont les plus sensibles avec des AUDPC dépassant 900, alors que les génotypes Merveille de Kelvedon, JI 1559 et Radley sont les plus résistants avec des AUDPC ne dépassant pas 300 (Figure 3.8 B).

En interaction avec la souche Arg1, le génotype le plus sensible était 2946, suivi par les génotypes P627 et P633, en enregistrant des AUDPC supérieurs à 400. Les trois génotypes Merveille de Kelvedon, New Season et JI 1559 étaient les plus résistants avec des AUDPC inférieurs à 105 (Figure 3.8 C). Pour la souche Arg3, le génotype 2946 est le plus sensible avec une valeur effective d'AUDPC de 738,04, suivi par le génotype P633 (669,7). Le génotype JI 1559 est le plus résistant à cette souche en enregistrant une valeur de 101,42, suivi par les génotypes P651 (112,47), JI 2480 (115,04) et P632 (123,12) (Figure 3.8 D).

Le calcul des valeurs minimales et maximales d'AUDPC correspondant aux 28 génotypes du pois, révèle la variabilité de leurs réponses vis-à-vis des quatre souches de *Fop* (Figure 3.9).

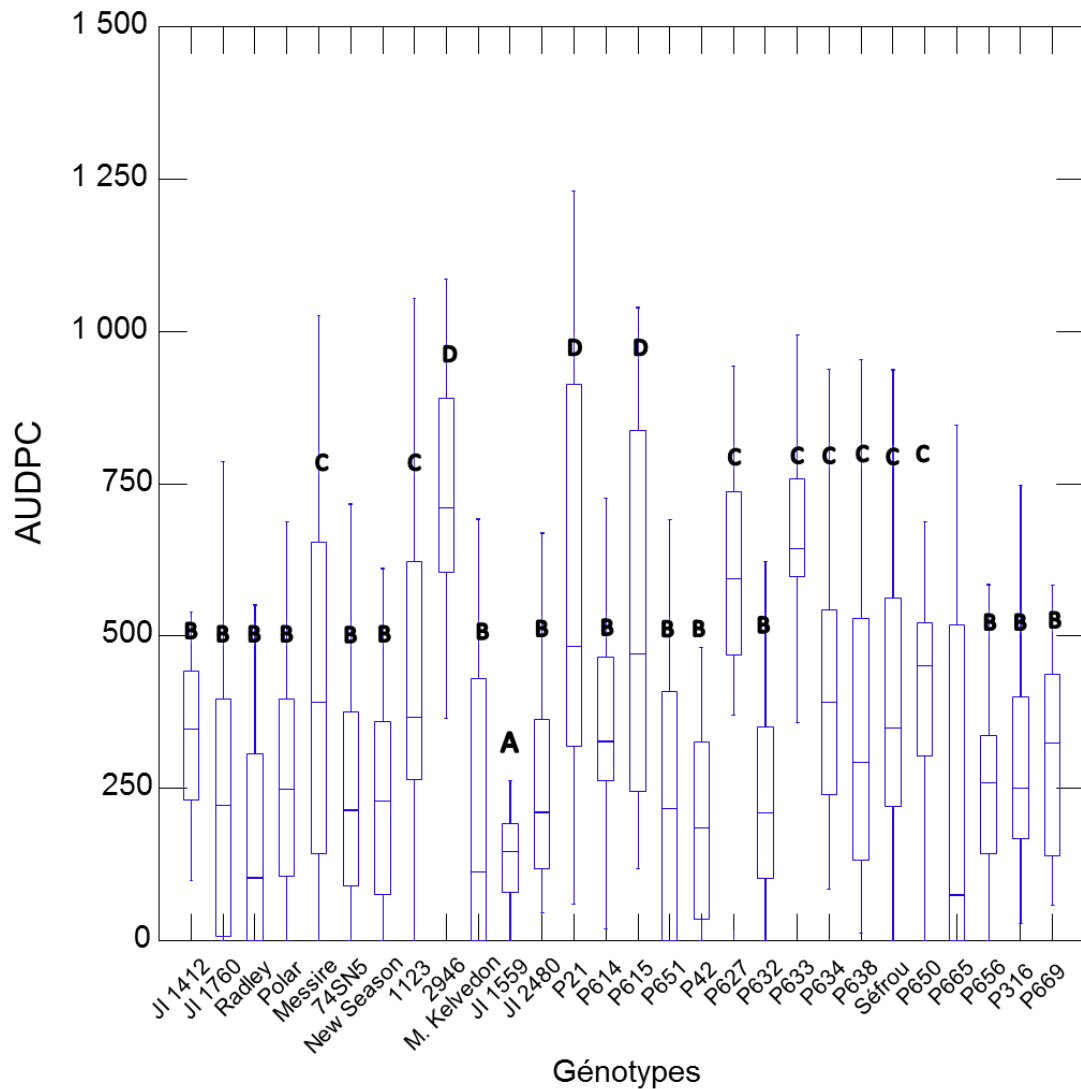


Figure 3.9 : Valeurs minimales et maximales d’AUDPC correspondant aux 28 génotypes étudiés de pois (test PPDs).

De cette manière, 4 groupes distincts peuvent être distingués. Le génotype JI1559 a enregistré des valeurs ne dépassant pas 250 avec toutes les souches utilisées (Figure 3.9 A). Le deuxième groupe, constitué par les génotypes JI1412, JI 1760, Radley, Polar, 74SN5, New Season, Merveille de Kelvedon, JI2480, P651, P42, P632, P656, P316 et P699, a montré des valeurs relativement faibles comprises entre 0 et 500 (Figure 3.9 B). Le troisième groupe contient les génotypes Messire, 1123, P627, P633, P634, P638, Séfrou et P650 qui ont enregistré des valeurs intermédiaires variant entre 100-750 (Figure 3.9 C).

Finalement le dernier groupe contient les trois génotypes 2946, P21 et P615 qui ont enregistré les AUDPC les plus élevés compris entre 250 et 1000 (Figure 3.9 D). 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 3.9).

En comparant les valeurs minimales et maximales d'AUDPC correspondant aux souches de *Fop* utilisées, nous avons pu déduire que les valeurs les plus importantes ont été enregistrées chez les génotypes inoculés avec la souche R2F42 (Figure 3.10 A). La race 1 représentée par la souche R1 est moins virulente que la souche R2F42 (Figure 3.10 B) mais plus virulente que les souches locales Arg1 et Arg3, qui sont les moins virulentes. Ces deux souches n'ont pas présenté des différences significatives entre elles (Figure 3.10 C).

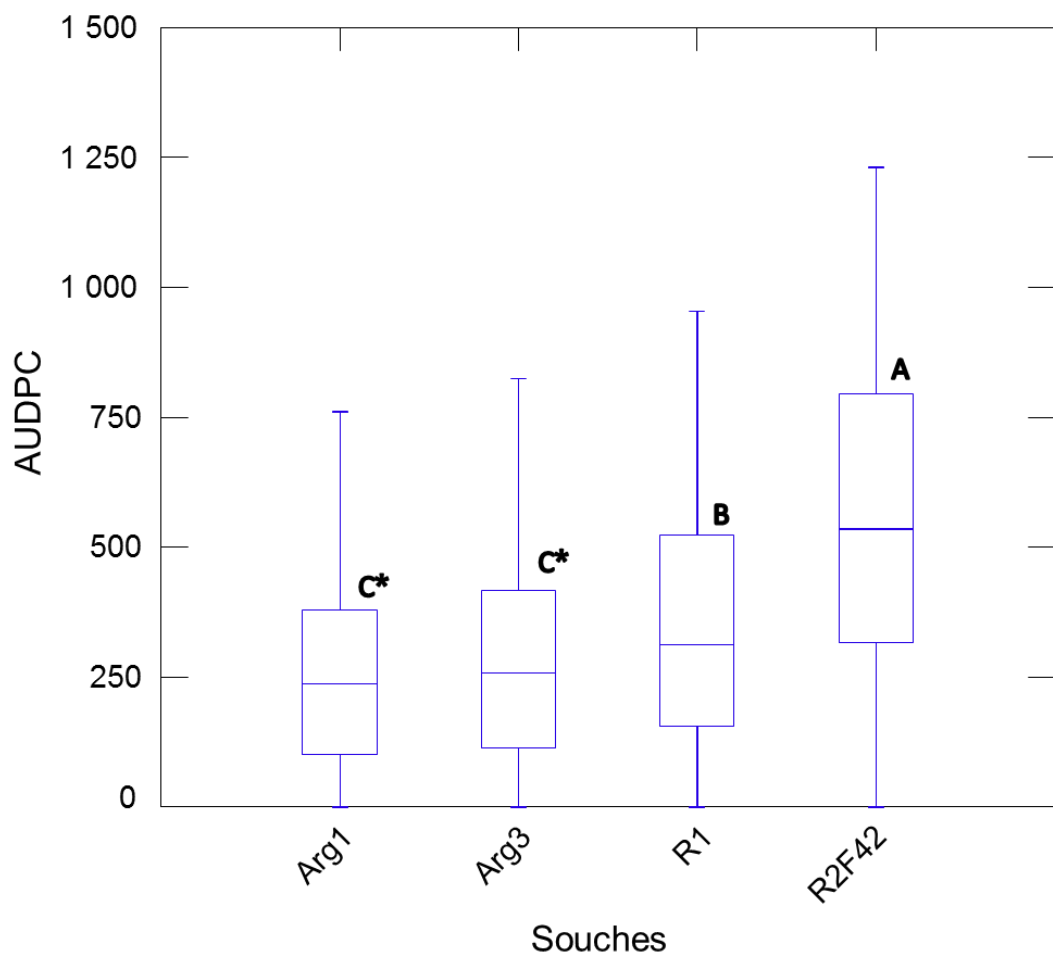


Figure 3.10 : valeurs minimales et maximales d'AUDPC correspondant aux quatre souches de *Fop* (test PPds).

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

3.2. Expérimentation en plein champ

3.2.1. Taux de germination

Dans les conditions naturelles en plein champ, nous avons enregistré des valeurs de taux germination allant de 10 jusqu'à 91,67 %. Le taux de germination le plus important (91,67%) a été enregistré chez les génotypes P669 (*P. fulvum*), JI 1760 et JI 2480 (*P. sativum*) (Figure 3.11).

Le taux de germination le plus faible était celui du génotype cultivé Merveille de Kelvedon (10%), suivi par l'espèce sauvage *Pisum sativum* ssp. *syriacum* représentée par le génotype P665 (18,33%) (Figure 3.11).

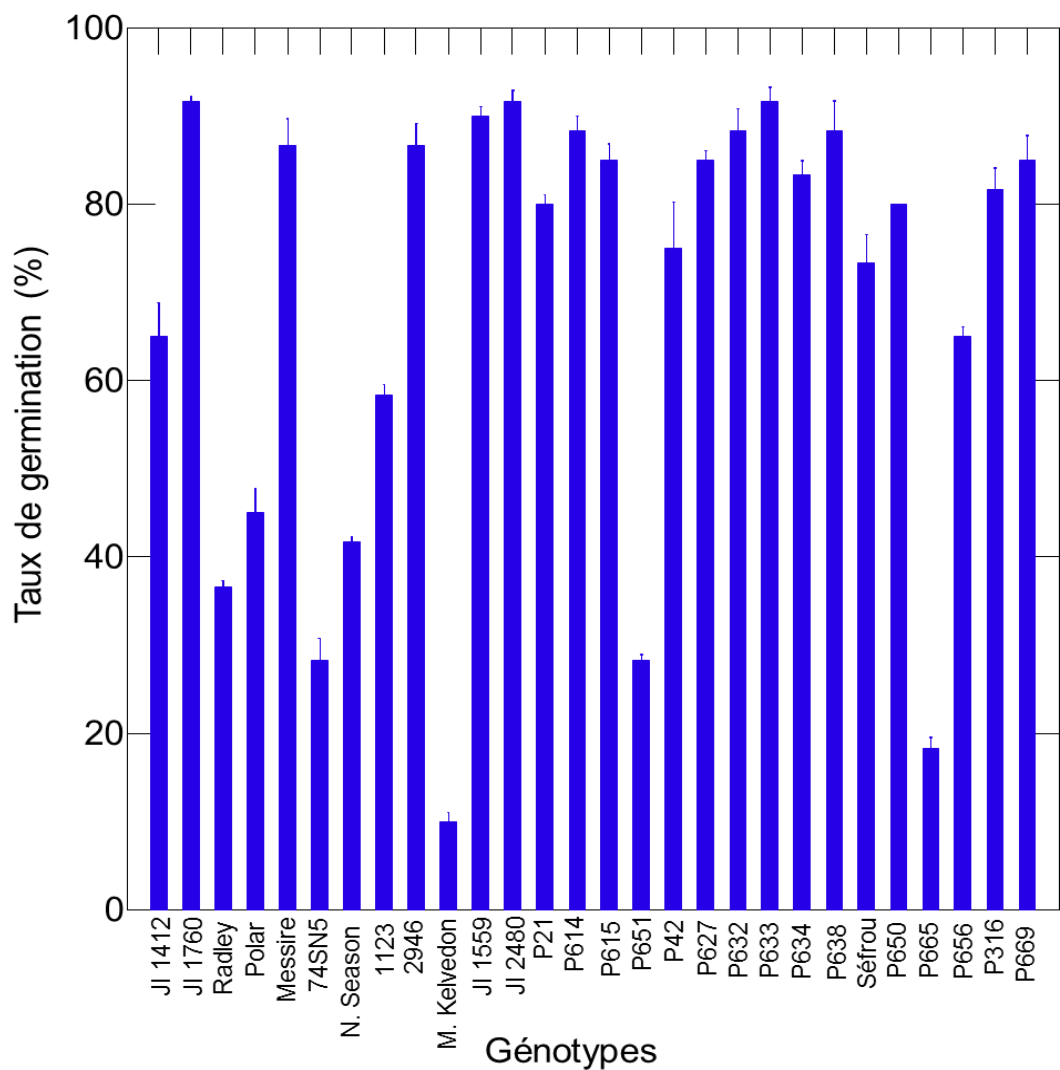


Figure 3.11 : Taux de germination des 28 génotypes de petit pois en plein champ.

3.2.2. Dates de floraison

La floraison chez les génotypes étudiés est assez variable. Elle s'est étendue sur un mois du 07 avril au 07 mai, soit 30 jours. La première floraison a été enregistrée avec le génotype Polar (*Pisum sativum* ssp. *sativum*), deux mois après le semis, suivi par le génotype Merveille de Kelvedon (*P. sativum* ssp. *sativum*), alors que le dernier génotype qui a fleuri était P316 (*P. fulvum*) le 07 mai (Figure 3.12).

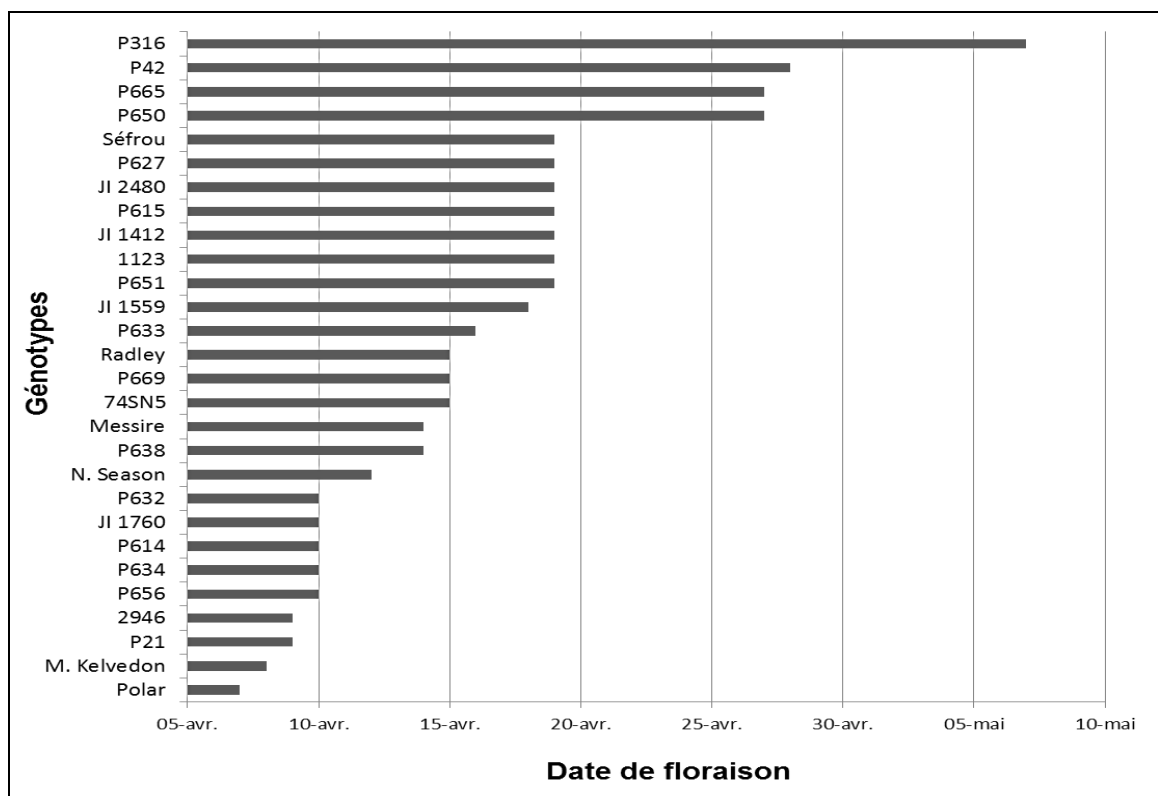


Figure 3.12 : Dates de floraison des 28 génotypes de petit pois en plein champ.

Les génotypes de la sous espèce *elatius* (P21, P614, P615 et P651), ont fleuri 7 semaines après le semis sur une période de 10 jours. La floraison des génotypes appartenant à la sous espèce *sativum* (Jl 1412, Jl 1760, Jl 1559, Jl 2480, Radley, Polar, Messire, 74SN5, New Season, 1123, 2946 et Merveille de Kelvedon), s'est étendue sur une période de 12 jours, alors que celle des génotypes appartenant à la sous espèce *arvense* (P42, P627, P632, P633, P634, P638 et Séfrou), s'est étendue sur une période de 18 jours. L'espèce *P. fulvum* représentée par les trois génotypes P656, P316 et P669, a fleuri 8 semaines après le semis sur une période de 27 jours. Les deux génotypes P650 et P665

appartenant aux sous espèces *jormadi* et *syriacum*, respectivement, ont fleuri le 27 avril, soit 10 semaines après le semis (Figure 3.12).

3.2.3. Taux d'infection

D'après nos observations et prospections de plein champ, nous avons enregistré un développement normal des différents génotypes avec absence de symptômes de flétrissement et de jaunissement dus au *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (Figure 3.13).



Figure 3.13 : Développement des génotypes dans des conditions de plein champ.

L'absence d'infection par *Fop* a été confirmée en réalisant des coupes longitudinales des tiges des différents génotypes. En effet, ces coupes ont montré l'absence de décoloration au niveau des vaisseaux conducteurs qui est une caractéristique des infections par *Fusarium oxysporum* phytopathogène (Figure 3.14).

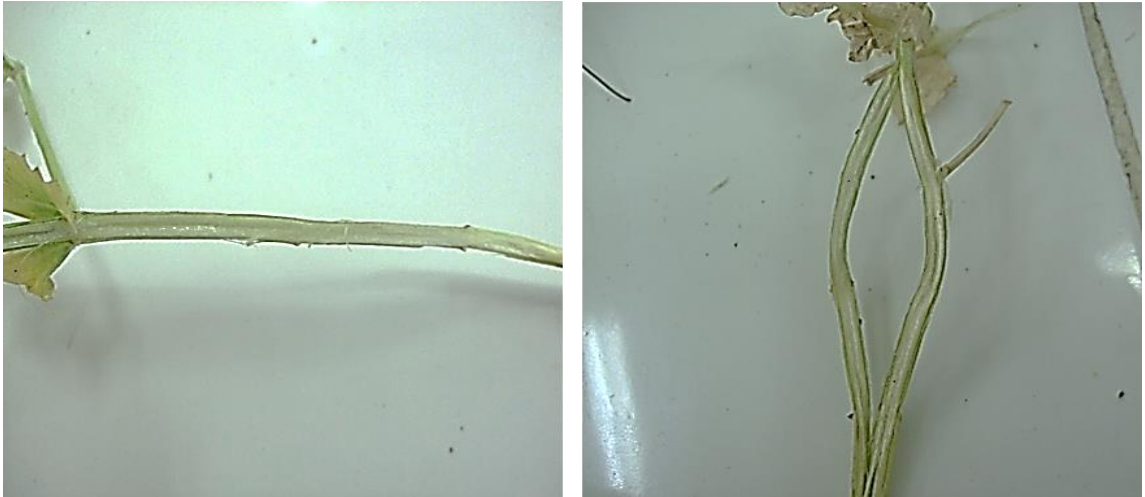


Figure 3.14 : Absence de décoloration des vaisseaux conducteurs chez les génotypes étudiés en plein champ.

3.2.4. Nombre de plantes et gousses

Sur un nombre total de 20 graines semées, la moyenne du nombre de plantes levées varie entre 1,66 (le génotype Merveille de Kelvedon) à 18,33 plantes (le génotype JI 1760). La moyenne du nombre de gousses produites est comprise entre 0.33 (le génotype P665) et 67 gousses (P656) (Figure 3.15).

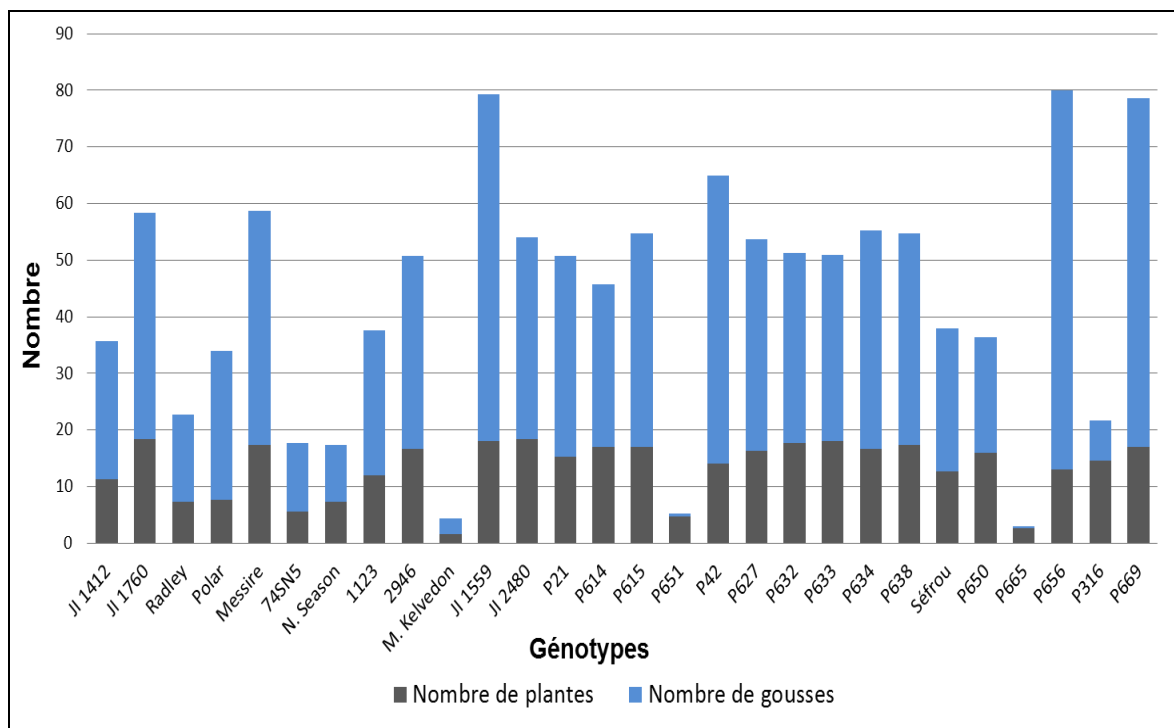


Figure 3.15 : Nombre de plantes et gousses produites par les 28 génotypes étudiés en plein champ.

3.2.5. Biomasse et poids des graines

La moyenne de la biomasse produite varie selon les génotypes étudiés. La valeur la plus importante était de 232,76 g enregistrée avec le génotype JI 1559, suivi par le génotype P614 (181,38 g). Les biomasses les plus faibles (0,39 g et 0,99 g) ont été enregistrés chez les génotypes P651 et P665, respectivement (Figure 3.16).

Le poids des graines produites varie entre 0,01g (P651) et 49,97g (JI 1760) (Figure 3.17 A). Le poids de 100 graines est compris entre 8,75g (P669) et 62,63 (JI 1760), alors les génotypes JI 1412, Radley, 74SN5, New Season, Merveille de Kelvedon, P651, P665 et P316 ont produit un nombre ne dépassant pas 77 graines (Figure 3.17 B).

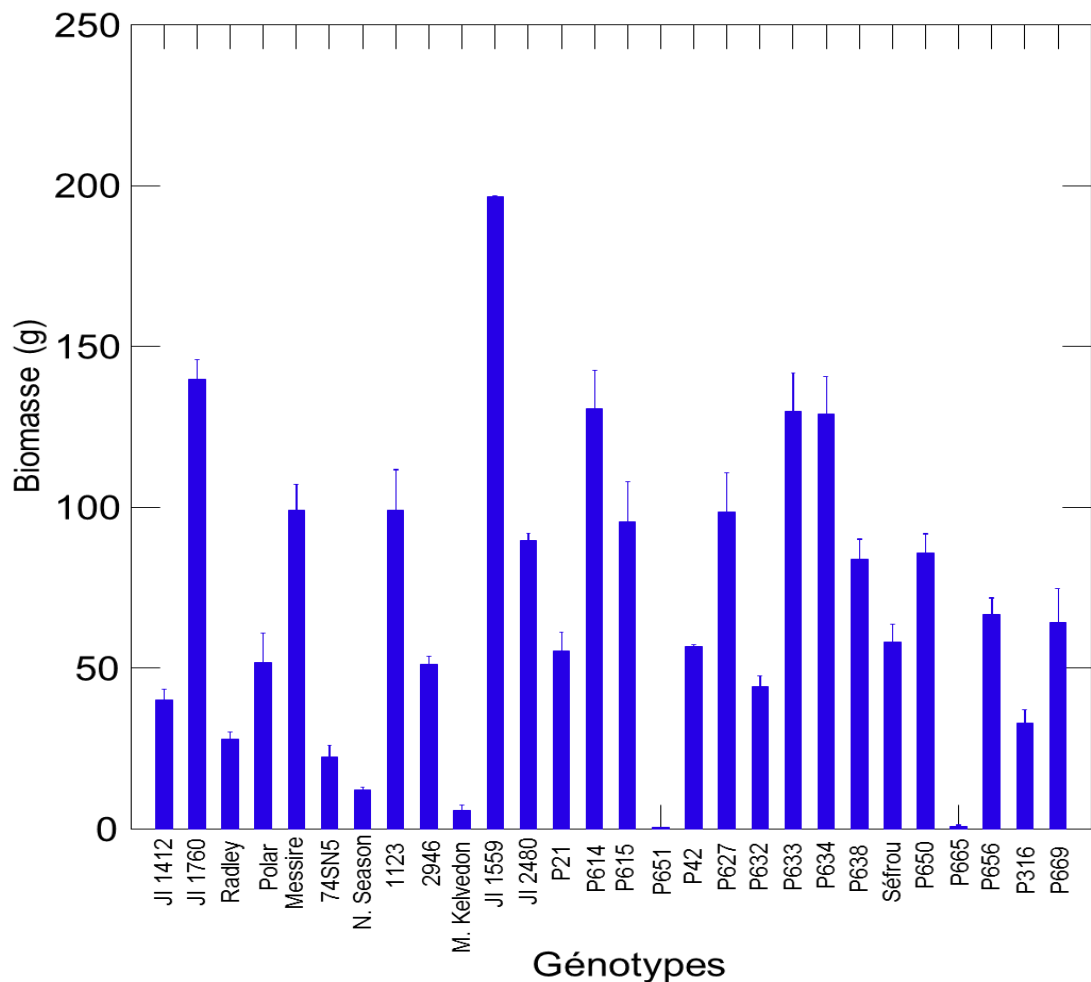


Figure 3.16 : Biomasse produites par les 28 génotypes étudiés du pois en plein champ.

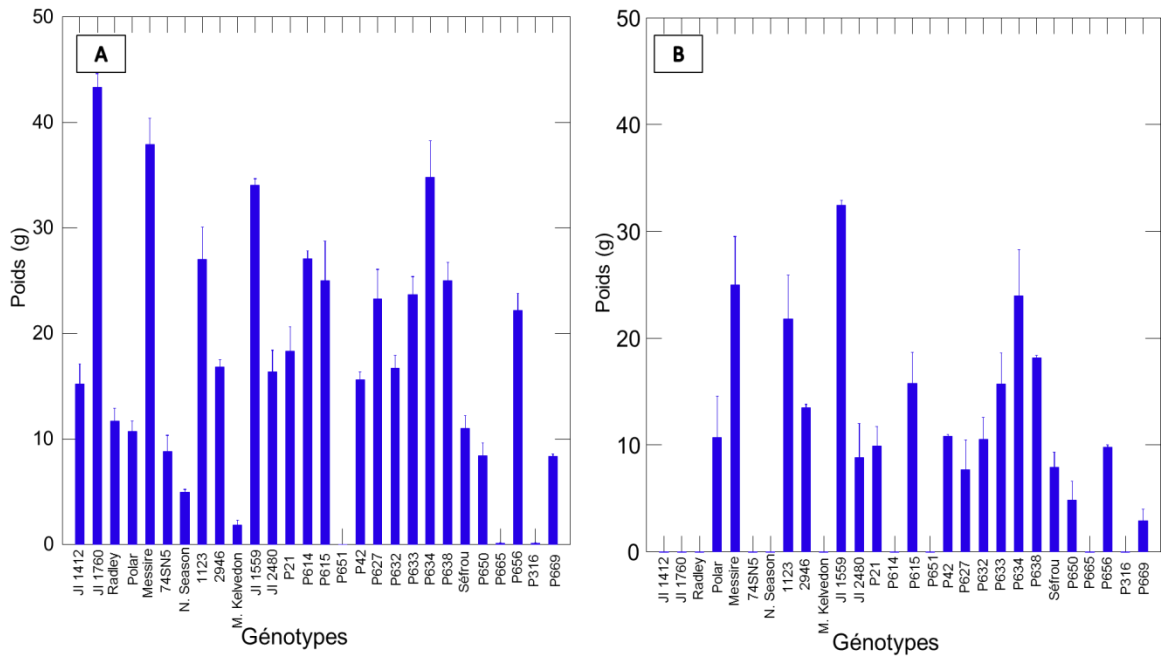


Figure 3.17 : Poids des graines produites par les 28 génotypes étudiés du pois en plein champ.

(A) Poids des graines totales et (B) poids de 100 graines.

3.3. Caractérisation moléculaire des isolats de *Fusarium oxysporum*

Avant de caractériser les nouvelles souches de *Fop* au niveau moléculaire, nous avons extrait les ADN génomiques de chaque souches. La séparation par électrophorèse des échantillons d'ADN montre une bande de haut poids moléculaire très intense pour tous les échantillons à l'exception de la souche M121B ce qui reflète un ADN de bonne qualité (Figure 3.18).

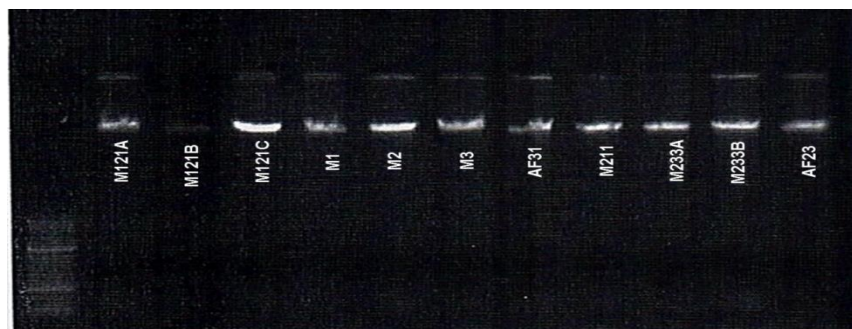


Figure 3.18 : Profil électrophorèse de la migration des ADN des 11 isolats fongiques.

Bien que la quantification de l'ADN par spectrophotométrie a montré de grande variation, tous les échantillons contiennent une quantité d'ADN supérieure à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Selon les échantillons, la quantité d'ADN varie de 1,45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (l'isolat M1) à 3,76 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (l'isolat M121C) (Tableau 3.1).

Tableau 3.1 : Concentration en ADN des échantillons d'extraction des 11 isolats fongiques étudiés.

Isolats fongiques	Concentration $\times 10$ (ng/ μl)
M121A	261,53
M121B	215,06
M121C	375,52
M1	144,87
M2	382,83
M3	178,51
AF31	176,35
M211	148,24
M233A	358,54
M233B	247,47
AF23	285,1

Pour procéder à la caractérisation moléculaire des isolats, nous avons amplifié les ITS et le facteur d'élongation alpha. Pour les ITS, la réaction de PCR a permis d'amplifier un seul fragment d'ADN à la taille espérée de 544-545 pb pour chaque isolat. La séparation des produits de la PCR a aussi révélé la grande similarité de la taille des fragments obtenus avec la souche de référence R2F42 de *Fop* (Figure 3.19 A) ce qui semble indiquer que tous les isolats correspondent à *F. oxysporum*.

Par contre, nous avons détecté des variations dans l'amplification du facteur d'élongation EF α 1. Une bande principale proche de 710bp a été détectée pour tous les isolats sauf pour AF23 et AF31. Cependant, la bande détectée varie de taille suivant l'isolat. Ainsi, les isolats M233B, M3, et M121A, B et C montre un fragment d'ADN à 710bp similaire à la souche de référence R2F42 alors que les souches M233A, M2 et M1 sont légèrement plus long (environ 720bp) ce qui démontre une certaine variabilité génétique entre les isolats (Figure 3.19 B).

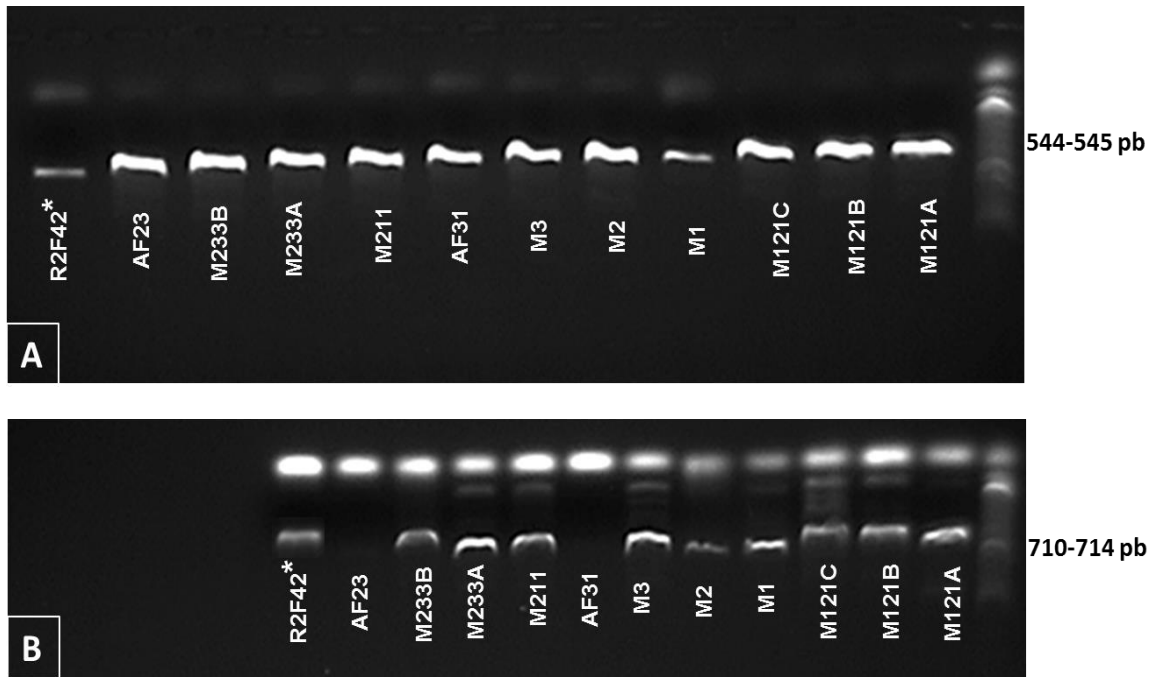


Figure 3.19 : Profil d'amplification des régions EFa1 et ITS des ADN des 11 isolats fongiques.

(A) : ITS ; (B) : EFa1 ; (*) : souche de référence.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1. Expression symptomatologique

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 [114]. Les quatre souches de *Fop* utilisées provoquent ce même tableau symptomatologique sur les génotypes étudiés. Dans nos essais en conditions semi-contrôlées, nous avons constaté que la souche R2F42 est plus virulente que les autres souches, en causant des symptômes plus intenses sur les génotypes susceptibles (Messire, P21, P634, P669, et Séfrou).

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 comme par exemple les génotypes Radley, Merveille de Kelvedon et P665. Ces symptômes peuvent être le résultat d'un déficit hydrique dû à l'occlusion des vaisseaux [114] 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 [115]. L'association de ces symptômes a été signalée chez les génotypes sensibles de pois en réponse aux quatre races de *Fop*.

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 [116, 9]. En accord avec ces observations, le tissu vasculaire de la plupart des génotypes inoculés par les souches R2F42, Arg1 et Arg3, a viré vers une couleur rouge foncée.

4.2. Paramètres d'évaluation de la maladie

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 [117, 17, 16]. Ainsi, nous avons utilisé ces paramètres pour différencier les réponses des 28 géotypes 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* et géotypes du pois).

En interaction avec la souche Arg1, le géotype le plus sensible était 2946 (*Pisum sativum* ssp. *sativum*), suivi par les géotypes JI 1412 (*P. sativum* ssp. *sativum*), P627 (*P. sativum* ssp. *arvense*), P656 et P316 (*P. fulvum*), en enregistrant des taux d'infection supérieurs à 25%. Les deux géotypes JI 1760 et 74SN5 (*P. sativum* ssp. *sativum*) étaient les plus résistants avec un taux d'infection inférieur à 5 %, suivi par les géotypes JI 1559, Merveille de Kelvedon, Radley *P. sativum* ssp. *sativum*) et P638 (*P. sativum* ssp. *arvense*). Pour la souche Arg3, le géotype P633 (*P. sativum* ssp. *arvense*) est le plus sensible suivi par 2946 et JI1412. Le géotype sauvage JI 2480 est le plus résistant à cette souche suivi par les deux géotypes JI 1559 et 74SN5.

En interaction avec la souche R1, c'est les deux géotypes P633 et P627 qui ont été les plus sensibles, suivis par Merveille de Kelvedon, P669 (*P. fulvum*), 2946, P21 (*P. sativum* ssp. *elatius*) et Messire (*P. sativum* ssp. *sativum*). Pour cette souche, les géotypes P651 (*P. sativum* ssp. *elatius*), JI 1760 et P632 (*P. sativum* ssp. *arvense*) ont enregistré des valeurs effectives du taux d'infection inférieures à 9%. En interaction avec la souche R2F42, les quatre géotypes 2946, P21, P634 (*P. sativum* ssp. *arvense*) et Messire ont enregistré des taux d'infection supérieurs à 60%. Les deux géotypes Radley et JI 1559 ont été les moins sensibles face à la souche R2F42 de *Fop*, suivis par 74SN5 et Merveille de Kelvedon.

Le taux d'infection seul apparaît insuffisant pour distinguer les réponses des géotypes étudiés [11]. Afin de décrire correctement la réaction des 28 géotypes étudiés 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). Un tel indice de sévérité a été adopté dans plusieurs études pour évaluer la résistance du pois vis-à-vis de la fusariose vasculaire [115, 117, 16]. 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.

Tous les génotypes étudiés inoculés avec la souche Arg1, ont enregistré des valeurs VIS inférieures à 2,5, tel le cas du génotype 2946 (2,15) et le génotype P656 (1,05). 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, dont les génotypes P651, P638, JI 1559, 74SN5, Radley, JI 2480 et P632, ont enregistré les valeurs les plus faibles. Le génotype P627 inoculé avec la souche R1, s'est avéré le plus susceptible en présentant une valeur effective de VIS de 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 se sont avérés les moins susceptibles envers cette souche et qui ont enregistré des valeurs inférieures à 1,2 sont Radley (1,09) et P651 (1,13). Restreindre l'évaluation de la maladie aux seules valeurs de taux d'infection et de VIS finaux semble limitée et ne reflète pas 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 [118].

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 a été 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.

4.3. Relation hôte-pathogène

Les 28 génotypes étudiés du pois ont présenté des comportements variables envers les quatre souches de *Fop*. 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 [119].

L'étude menée par BANI *et al.*, (2012), a révélé une variabilité des réponses de 73 accessions de *Pisum* spp. face à la souche R2F42 de *Fop*, qui ont varié entre résistance et susceptibilité, avec des accessions 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. Comme résultat de cette étude, 11 nouvelles sources de résistance ont été identifiées et confirmées : JI1412, JI1559, JI1760, P23, P42, P614, P627, P633, P639, P650 et P656) et qui peuvent être utiles dans des programmes d'amélioration [16].

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* [69].

4.4. Comportement des génotypes du pois en plein champs

La réalisation de l'expérimentation en plein champ a révélé l'absence de l'infection des 28 génotypes étudiés du pois par *Fop*. L'apparition de la fusariose vasculaire est conditionnée par la présence des chlamydospores dans le sol avec des températures de 21°C pour la race 1 ou de 26°C pour la race 2 [98]. Dans

notre travail, les températures moyennes des deux mois suivant le semis des 28 génotypes, ont été comprises entre 7,4°C et 23,5°C (de 19 février au 16 avril) (Appendice D). Durant cette période, nous avons enregistré 3 jours seulement avec des températures de 21,6°C, 22°C et 23, 5°C, alors que les températures moyennes des autres jours n'ont pas dépassé 20°C.

Le pois a besoin d'un climat relativement frais ; les températures moyennes doivent être comprises entre 7 et 24 °C et, pour des rendements optimaux, entre 13 et 21 °C, bien que les meilleures performances de croissance végétative et de développement soient atteintes à des températures beaucoup plus élevées. *Pisum sativum* est cultivé jusque dans des régions où les précipitations ne dépassent pas 400 mm, mais la pluviométrie idéale est de 800-1000 mm/an [26]. Dans notre région d'étude (Soumâa, Blida), les températures moyennes ont été comprises entre 6,8 et 28,4°C, avec une pluviométrie maximale de 156 mm/mois.

Le pois pousse sur des sols de toutes natures, dotés de niveaux de fertilité modérée, bien drainés et à pH de 5,5 à 7,0, bien que certains cultivars tolèrent un pH allant jusqu'à 7,5. Il est très affecté par l'acidité du sol, la toxicité de l'aluminium et l'asphyxie racinaire [26]. Dans notre travail, le sol de la parcelle est considéré comme sableux limoneux, équilibré en matière organique et d'un pH de 7,30.

Le taux de germination des 28 génotypes semés en plein champ a varié de 10% à 91,67%. Les génotypes appartenant à la sous espèce *sativum* ont enregistré des taux de germination variant de 10% (Merveille de Kelvedon) à 91,67% (JI 1760 et JI 2480). Les génotypes de la sous espèce *elatius* ont enregistré des taux de 80% (P21) à 88,33% (P614), alors que les génotypes de la sous espèce *arvense* ont montré des taux de germination très élevés variant entre 73, 33% (Séfrou) et 91, 67% (P633). Les deux sous espèces *jormadi* (P650) et *syriacum* (P665) ont montré des taux de 80% et 18,33%, respectivement. L'espèce *P. fulvum* représentée par les génotypes P651, P316, P656 et P669, a enregistré des taux de germination variant de 18,33% (P651) à 85% (P669).

Chez certains cultivars de pois, les fleurs paraissent 5 à 7 semaines après la levée [26]. Chez les 28 génotypes étudiés, la floraison du premier génotype (Polar) s'est achevée 7 semaines après le semis, tandis que le dernier génotype

(P316) a fleuri 11 semaines après le semis. Du point de vue croissance végétative, la biomasse produite, le nombre de gousses et le poids des graines, ont varié en fonction du génotype, une telle remarque a été également soulevée chez d'autres collections de pois [120, 121].

Le nombre de gousses le plus important a été enregistré chez les deux génotypes P656 et P699 (*P. fulvum*), suivis par le génotype JI 1559 (*P. sativum* ssp. *sativum*). Une étude de caractérisation des génotypes appartenant aux deux espèces *P. sativum* et *P. fulvum*, suggère que la plupart des génotypes produisent un nombre de gousses très important, dans des conditions de plein champ [122].

4.5. Caractérisation moléculaire des isolats

L'amplification par PCR des deux régions chromosomiques (EF- α 1 et ITS) de 11 isolats fongiques préalablement identifiés en tant que *Fusarium oxysporum*, nous a permis de constater que les produits de la PCR ont été similaires aux amplifiats de la souche de référence R2F42 de *Fop*, bien que de petite variation en taille ont été détectés entre les isolats. Le facteur d'élongation alpha 1 (EF- α 1) a été utilisé par SKOVGAARD et al. (2002), pour caractériser des *F. oxysporum* isolés à partir du sol et des racines nécrosées du pois (*Pisum sativum*). D'après les résultats de cette étude, les séquences obtenues avaient un taux de diversité de nucléotides de 3.5% [123].

Les ITS ont été utilisés pour distinguer des formes spéciales et des races de *F. oxysporum*, malgré qu'ils ne soient pas monophylétiques et devraient être utilisés seulement dans la caractérisation phénotypique et pas comme indicateurs de parenté génétique ou évolutionnaire [54, 124]. Nos résultats supportent ces observations puisque nous avons détecté un fragment identique pour tous les isolats analysés. L'analyse des ITS seul n'est donc pas suffisante pour distinguer les formes spéciales et races des isolats. Pour cela, il est indispensable de recourir aux tests de pathogénicité sur le pois pour distinguer la forme spéciale *pisi* et même la gamme variétale pour différencier les différentes races de ce pathogène [10].

CONCLUSION

La fusariose vasculaire du pois, causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, a été signalée dans tous les pays où le pois est cultivé. La maladie est souvent sévère là où on pratique de courtes rotations avec d'autres cultures. Dans ces conditions, quand le pathogène développe des quantités suffisantes d'inoculum et en présence d'un cultivar sensible, il en résulte des pertes économiques considérables. En raison de l'efficacité réduite du contrôle chimique de cette maladie et de la pollution et risques sanitaires associés à ce type de méthode de contrôle, l'utilisation de cultivars résistants aux différentes races du pathogène, semble être la mesure la plus appropriée.

Notre travail avait pour objectif d'étudier le pathosystème *Pisum* spp.-*Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. La première partie de notre travail a été effectuée dans des conditions semi-contrôlées sous serre, afin d'étudier l'interaction d'une collection de 28 génotypes de *Pisum* spp. avec quatre souches phytopathogènes de *Fop*. Ces dernières ont induit des symptômes typiques de la maladie : des flétrissements, des jaunissements et des dessèchements des feuilles et des décolorations des vaisseaux et des racines. Les différents génotypes étudiés ont réagi d'une façon différentielle suivant la souche inoculée de *Fop*.

Trois paramètres d'évaluation de la maladie ont été utilisés à savoir le taux d'infection, le VIS et l'AUDPC. Le calcul de ces trois paramètres nous a permis de différencier les réponses des génotypes étudiées suite à leur inoculation avec les souches de *Fop*. Les taux d'infection les plus élevés ont été enregistrés chez les génotypes 2946, P21, Messire et P634 inoculés avec la souche R2F42 (>60%), tandis que les valeurs les plus faibles ont été enregistrées chez les génotypes JI 1760, 74SN5 et JI 1569 inoculés avec les souches Arg1 et Arg3 (<10%). Pour le VIS, les valeurs les plus importantes ont été enregistrées chez les génotypes 2946, P21, Messire et P634 inoculés avec la souche R2F42 (>3,5), alors que les valeurs les plus faibles ont été notées chez Radley inoculé avec les quatre souches et chez 74SN5, P651, P638, P669, P656, P665 et JI 1559 inoculés avec

les souches Arg1 et Arg3. Quant à l'AUDPC, qui intègre l'intensité des symptômes et leur progression dans le temps, les valeurs les plus importantes sont enregistrées chez P21, 2946 et P615 inoculés avec la souche R2F42, tandis que les plus faibles ont été enregistrées chez JI 1559 et Merveille de Kelvedon inoculés avec les souches Arg1 et Arg3. Le calcul des AUDPC nous a permis de constater que la souche R2F42 est la plus virulente, en enregistrant les valeurs les plus importantes, suivie par la souche R1. Les deux souches locales Arg1 et Arg3 sont les moins virulents en enregistrant les AUDPC les plus faibles.

La deuxième partie du travail s'est intéressée à évaluer le comportement des 28 génotypes de *Pisum* spp. vis-à-vis de la fusariose vasculaire du pois, dans des conditions d'infection naturelle en plein champ. Nous avons enregistré un développement normal des différents génotypes avec absence de symptômes de flétrissement et de jaunissement dus au *Fop*. L'absence de la maladie peut être imputée à l'absence de l'inoculum du pathogène dans le sol et/ou aux conditions défavorables à son développement. Il devient donc obligatoire de vérifier sa présence pour une évaluation effective.

Le taux de germination, la date de floraison, le nombre de plantes et gousses, la biomasse produite et le poids des graines des génotypes étudiés, sont les paramètres qui ont été évalués dans l'expérimentation en plein champ. Les taux de germination les plus élevés ont été notés chez les génotypes JI 1760, JI 2480 et P638. La date de floraison s'est étendue sur un mois du 07 avril au 07 mai. Le premier génotype qui a fleuri était Polar. Le nombre de plantes levées a varié entre 1,66 (Merveille de Kelvedon) et 18,33 (JI 1760). Le nombre de gousses le plus important a été enregistré chez le génotype P656 (67 gousses). Le génotype JI 1559 a produit la biomasse la plus importante (232,76 g), tandis que le poids des graines et le poids de 100 graines les plus importants ont été notés chez les génotypes JI1760 (49,97 g) et JI1559 (32,42 g), respectivement.

La troisième partie du travail a visé la caractérisation moléculaire de 11 nouveaux isolats locaux, préalablement isolés à partir des plants porteurs de symptômes évidents de la fusariose vasculaire. Une PCR a été réalisée afin d'amplifier le facteur d'élongation alpha 1 (EF α 1) et la région intergénique (ITS). D'après les résultats obtenus, l'appartenance des 11 isolats à l'espèce *F.*

oxysporum a été confirmée suite à la comparaison des produits d'amplification avec ceux de la souche de référence R2F42 de *Fop*. Cependant, il est indispensable d'effectuer un test de pathogénicité sur le pois ainsi que d'utiliser les variétés différentielles pour identifier les différentes races du pathogène.

Les géotypes de *Pisum* spp. ayant montré des niveaux importants de résistance, 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 géotypes pour 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 géotypes 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
AUDPC	<i>Area Under the Disease Progress Curve</i>
CSIC	<i>Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Spain)</i>
dNTP	Désoxy-N tri-phosphate
EDS	Eau Distillée Stérile
EF α 1	<i>Elongation Factor Alpha 1</i>
f.sp.	Forme spéciale
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
<i>Fop</i>	<i>Fusarium oxysporum f.sp. pisi</i>
G	Grossissement
IAS	<i>Institute of Sustainable Agriculture (Cordoba, Spain)</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
Mb	Million paires de base
pb	Paire de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar (milieu de culture)</i>
PDB	<i>Potato Dextrose Broth (milieu de culture)</i>
pH	Potentiel hydrogène
PPds	Plus Petite différence significative
rpm	Rotation par minute
TAE	Tris/Acétate/EDTA (EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique)
UV	Ultra-violets
VIS	<i>Visual Index of Severity</i>

Appendice B

Milieux 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.

Appendice C

Pays d'origine des géotypes étudiés du pois

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

Appendice D

Données de la pluviométrie de la région de Soumaâ, Blida (de décembre 2014 jusqu'au juin 2015)

Jours	décembre	janvier	février	mars	avril	mai	juin
1	47	0	0,5	0	0	0	0
2	6,2	0	0,8	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	15,5	2	0	0	0
5	0	0	3,5	0	0	0	0
6	16	0	0	0	0	0	0
7	2,2	0	0	0	0	0	0
8	7,8	0	0	0	0	0	0
9	20	0	0,5	0	0	0	0
10	0,5	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	11	0	0	7,5
15	0	5	5	0	0	0	0
16	10,5	0	1	0	0	0	0
17	0	14,5	9,5	0	0	0	0
18	0	0	2,5	0	0	2,4	0
19	0	14,7	0	0	0	5,2	0
20	0	6,2	6	2	0	0	0
21	0	2,2	14	18	0	0	0
22	0	35	5,1	0	0	0	0
23	0	10,5	0	0	0	0	1,5
24	0	11,5	0,7	36	0	4	0
25	0	0	8,7	27,7	0	0	0
26	0	0,5	7	0	0	0	0
27	0	3,6	6	0	0	0	0
28	13,3	0	0	0	0	0	0
29	25,3	0		0	0	9,5	0
30	2,7	0		0	0	0	0
31	4,5	15		0		0	
PJ max (mm)	47	35	15,5	36	0	9,5	7,5
Jour du max	1	22	4	24	1	29	14
Nbre jours pluvieux	12	11	16	6	0	4	2
Totaux (mm)	156	118,7	86,3	96,7	0	21,1	9

Source : Agence Nationale des Ressources Hydrauliques (ANRH Soumaâ, Blida).

Appendice E

Températures moyennes des six premiers mois de l'an 2015 de la région de Soumaâ, Blida

Jours	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai	Juin
1	8,5	9,6		17,2	20,8	22,5
2	8,5		21,6	14,3	23,8	21,3
3	9,2		18,8	15	26,5	
4	10,7		14,3	14,6	28,2	
5	9,8		9,7	14,5	23,9	
6	10,1	6,9	9,5	13,3	21,2	
7	9,7	7,2	10,3	12,3	19,6	
8	9,5	6,8	9,6	13,1	20,9	
9	8,9	6,9	10,4	16,2	21,5	
10	9,6	9,7	10,6	18,3	21,9	
11	10,1	11,5	13,4	17,2	24,4	
12	7,3	11,2	15,2	16,2	20,5	
13	12,6	10,9	13,4	18	21,9	
14	12,3	12,4	11,8	19,5	28,4	22,3
15	15,1	13,6	9,1	23,5	20,3	21,2
16	15,3	12,4	10,5	18,4	18,1	21
17	9,6	10,1	10,8	17,5	18,7	20,9
18	8,9		12,9	16,5	21,3	22,5
19	10		22	17,2	22,1	22,8
20	9,1	10,1	20,6	16,5	16,7	23,7
21	8,3	10	13,9	17,4	16,4	25,3
22	7	7,4		20,3	16	27,4
23	7,3	9,8		17,5	17,3	23,5
24	9,6	9,6	12	17,8	17,4	20,4
25	8,6	11,1	10,7	18,3	16,1	
26				20,2	18,4	
27				18,6	18	
28				18,8	19,8	
29				17,8	17	
30			20,3	19		
31			18,7			

Source : Agence Nationale des Ressources Hydriques (ANRH Soumaâ, Blida).

Appendice F

Granulométrie et caractéristiques physico-chimique du sol de la station expérimentale (Univ. de Blida 1, Faculté SNV, Département des Biotechnologies)

Taux d'argile (A %)	9,25%
Limons fins (LF %)	12,78%
Limons grossiers (LG %)	11,63%
Sable fin (SF %)	32,73%
Sable grossiers (SG %)	33,61%
CE	0,035
pH	7,3
CT	1,8
MO	22,75
C	15,99
C /N	32,6
N	0,49
P	27,23
K	231,9

Source : Institut Technique des Arbres Fruitiers et de la Vigne (ITAFV Boufarik, Blida).

Appendice G

Moyennes des taux d'infection (%) des 28 géotypes étudiés du pois inoculés
avec la souche R1 de *Fop*

Géotypes	7j	10j	13j	16j	19j	22j	25j	28j	31j
JI 1412	3,33	26,39	47,22	50,48	59,52	57,54	55,65	51,19	59,38
JI 1760	0,00	13,89	28,27	36,24	40,97	47,39	55,34	54,43	51,88
JI 1559	31,11	33,17	38,57	48,89	50,42	58,07	61,82	70,32	79,44
JI 2480	21,11	18,65	30,95	41,96	46,99	49,07	50,74	61,48	75,56
Radley	0,00	0,00	9,52	12,56	28,47	32,87	34,26	41,85	44,00
Polar	0,00	32,38	36,11	40,48	46,43	46,43	46,73	50,00	57,41
Messire	20,00	38,61	46,19	53,10	59,23	63,39	66,17	68,95	70,44
74SN5	6,67	18,33	19,44	36,51	44,05	56,35	58,63	61,90	59,13
N. Season	0,00	25,56	30,16	40,08	41,37	45,37	49,40	50,37	55,21
1123	32,22	29,76	41,17	51,19	57,14	60,75	56,94	63,43	62,42
2946	43,33	45,56	51,67	57,94	72,62	70,34	68,85	70,04	74,01
P21	31,11	29,37	45,24	52,08	59,03	58,80	67,59	69,31	75,69
P42	21,43	23,21	38,66	46,76	53,75	65,00	68,18	75,53	71,46
P316	0,00	12,22	28,97	31,35	31,35	42,82	45,14	40,37	46,06
P614	33,33	28,57	40,48	50,00	56,48	57,96	61,67	73,33	78,33
P615	41,67	43,89	46,03	50,00	52,78	62,96	79,20	80,83	81,11
P627	52,22	45,00	45,48	53,33	56,75	53,97	56,75	66,93	71,83
P632	37,78	42,14	43,33	52,06	50,48	57,74	54,70	62,70	61,14
P633	32,22	33,33	46,43	50,00	50,00	63,43	65,97	71,11	74,26
P634	30,00	30,56	34,92	38,89	44,25	52,98	52,31	51,85	58,52
P638	32,22	30,56	36,51	52,68	56,85	62,04	64,44	67,41	70,93
P650	21,67	25,56	36,11	47,62	52,08	62,27	61,34	66,58	69,12
P651	0,00	0,00	9,52	9,52	8,33	10,00	10,00	6,06	14,44
P656	21,75	20,04	34,33	31,94	37,22	40,00	43,03	43,91	57,45
P665	0,00	5,56	14,29	19,05	16,67	16,67	20,83	24,54	41,20
P669	17,86	18,15	32,77	38,66	49,77	46,06	48,64	59,55	73,48
Séfrou	37,22	36,11	46,43	52,35	63,53	69,03	73,33	79,58	88,83
M.Kelvedon	0,00	5,56	5,56	26,19	31,75	31,75	30,16	44,44	51,79

Appendice H

Moyennes des valeurs VIS des 28 géotypes étudiés du pois inoculés avec la souche R2F42 de *Fop*

Géotypes	7j	10j	13j	16j	19j	22j	25j	28j	31j
JI 1412	1,03	1,39	1,81	1,86	2,18	2,36	2,54	2,97	3,00
JI 1760	1,13	1,25	1,72	1,80	1,95	2,22	2,68	3,25	3,50
JI 1559	1,23	1,36	1,38	2,23	2,23	2,39	2,37	2,37	2,41
JI 2480	1,09	1,20	1,40	1,77	1,90	2,65	2,89	3,26	3,50
Radley	1,00	1,14	1,28	1,39	1,35	1,38	1,43	1,50	1,48
Polar	1,00	1,33	1,87	1,98	2,24	2,33	2,46	2,50	2,92
Messire	1,33	1,48	1,97	2,31	2,79	3,12	3,62	4,15	4,35
74SN5	1,00	1,18	1,34	1,36	1,96	2,19	2,18	2,27	2,53
N. Season	1,03	1,29	1,69	1,69	1,97	2,21	2,34	2,53	2,53
1123	1,29	1,39	1,48	2,67	2,72	3,00	3,70	3,77	4,13
2946	1,34	1,42	1,60	3,17	3,26	3,75	4,21	4,63	5,00
P21	1,38	1,40	1,70	3,11	3,31	4,24	4,56	4,17	5,00
P42	1,10	1,29	1,48	2,36	2,46	2,80	2,60	3,18	3,60
P316	1,23	1,22	1,42	1,74	1,90	1,92	1,93	2,02	2,10
P614	1,37	1,39	1,48	2,47	2,64	2,69	2,66	2,69	2,62
P615	1,40	1,43	1,52	3,36	3,44	4,53	4,76	4,98	5,00
P627	1,47	1,44	1,50	2,51	2,42	2,58	2,85	3,02	3,22
P632	1,39	1,45	1,50	2,76	2,93	2,96	3,06	3,02	3,27
P633	1,29	1,45	1,46	2,50	2,55	3,15	3,16	3,33	3,51
P634	1,32	1,34	1,40	2,17	2,12	2,72	3,60	4,01	4,45
P638	1,39	1,42	1,41	2,19	2,46	2,78	2,97	3,06	3,50
P650	1,21	1,32	1,50	2,68	2,73	2,96	3,03	3,22	3,40
P651	1,00	1,06	1,21	1,21	1,30	1,30	1,35	1,33	1,48
P656	1,15	1,16	1,34	1,71	1,87	1,77	1,72	1,75	1,90
P665	1,00	1,10	1,30	1,27	1,56	1,55	1,59	1,59	1,58
P669	1,23	1,29	1,61	1,99	1,99	2,14	2,09	2,09	2,34
Séfrou	1,45	1,38	1,62	2,69	2,98	3,25	3,83	3,45	3,70
M.Kelvedon	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,03	1,06	1,18	1,38

Appendice I

Moyennes des valeurs AUDPC des 28 géotypes étudiés du pois en interaction avec les quatre souches de *Fop*

Géotypes	R1	R2F42	Arg1	Arg3	EDS
JI 1412	1197,51	1358,71	1182,68	1200,22	881,88
JI 1760	935,18	1245,49	862,74	863,73	753,24
JI 1559	1378,19	1356,55	1248,91	1267,51	1166,09
JI 2480	1124,09	1374,78	1035,99	964,71	849,66
Radley	544,62	613,90	511,68	623,05	468,20
Polar	1046,53	1239,50	1103,73	953,53	828,96
Messire	1439,79	1810,71	1146,57	1256,83	1014,29
74SN5	1034,35	1052,34	908,21	950,28	746,13
N. Season	980,85	1255,16	879,29	1021,11	791,19
1123	1347,09	1742,00	1298,03	1249,51	965,34
2946	1664,80	1993,17	1660,83	1771,72	1033,68
P21	1425,39	2066,01	1249,50	1418,14	950,13
P42	1341,90	1445,49	1288,46	1333,23	1181,00
P316	790,20	1173,79	883,37	929,57	633,98
P614	1396,79	1619,02	1270,00	1414,10	1072,21
P615	1602,36	2025,00	1376,88	1511,85	1070,48
P627	1515,12	1514,73	1392,80	1181,09	790,62
P632	1397,66	1626,01	1434,44	1337,35	1217,38
P633	1431,65	1524,19	1289,88	1414,68	744,98
P634	1171,15	1602,38	1219,58	1135,85	868,41
P638	1391,71	1638,22	1202,98	1173,55	1002,65
P650	1285,31	1474,54	1325,39	1248,24	912,57
P651	181,99	623,02	363,23	179,58	166,71
P656	953,79	969,11	872,95	1002,31	700,33
P665	425,69	631,44	361,07	369,09	220,10
P669	1089,82	1165,08	984,16	1052,35	759,61
Séfrou	1596,81	1743,27	1282,53	1456,52	1132,89
M.Kelvedon	614,98	110,71	56,94	163,99	30,46

Appendice G

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

Taux d'infection

Facteur	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ratio	Valeur p
Géotype	56 571,512	27	2 095,241	13,243	0,000***
Souche	45 625,682	3	15 208,561	96,126	0,000***
Géotype*Souche	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
Géotype	111,233	27	4,120	12,870	0,000***
Souche	113,857	3	37,952	118,565	0,000***
Géotype*Souche	105,582	81	1,303	4,072	0,000***

(***) : Différences très hautement significatives.

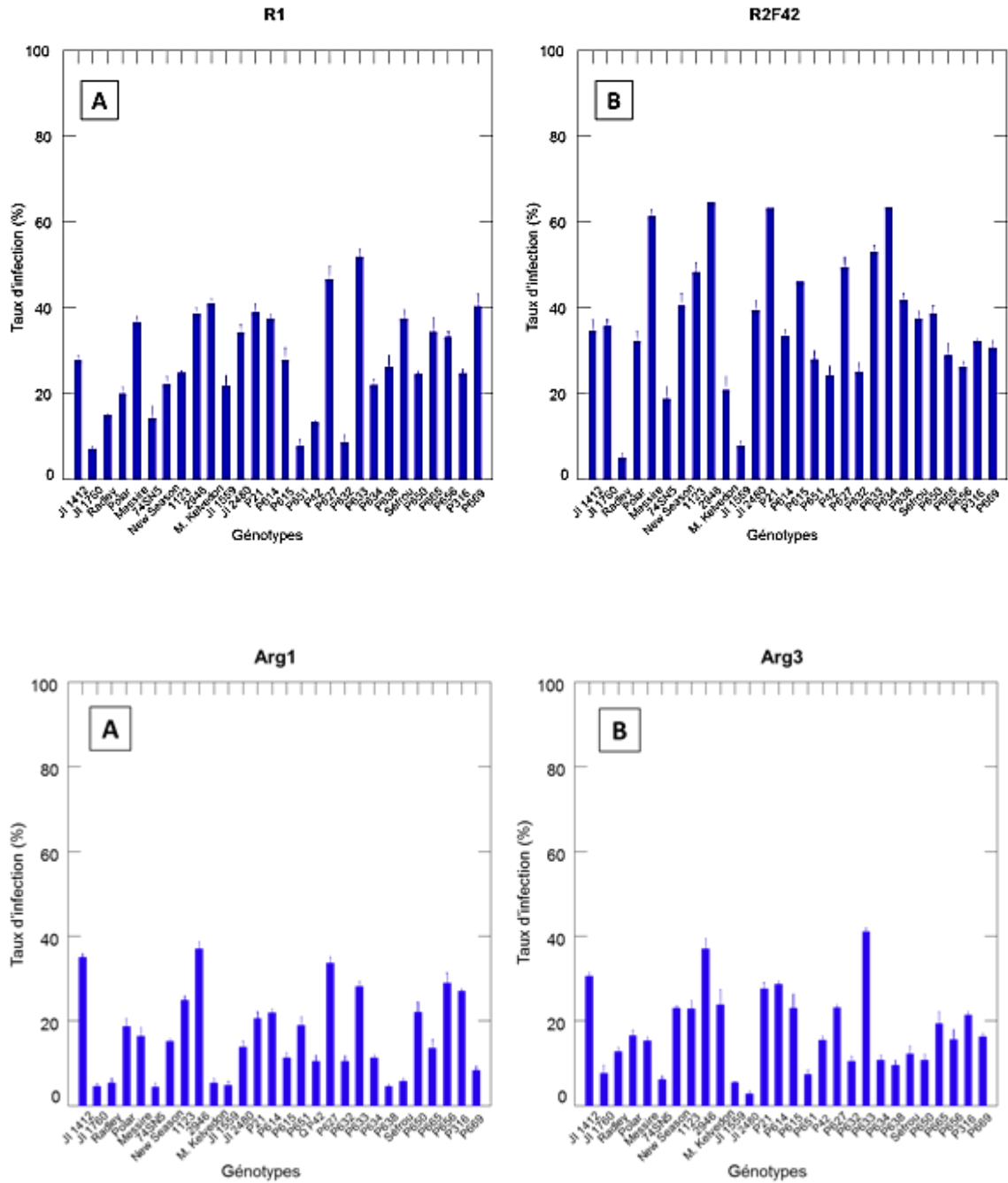
AUDPC

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

(***) : Différences très hautement significatives.

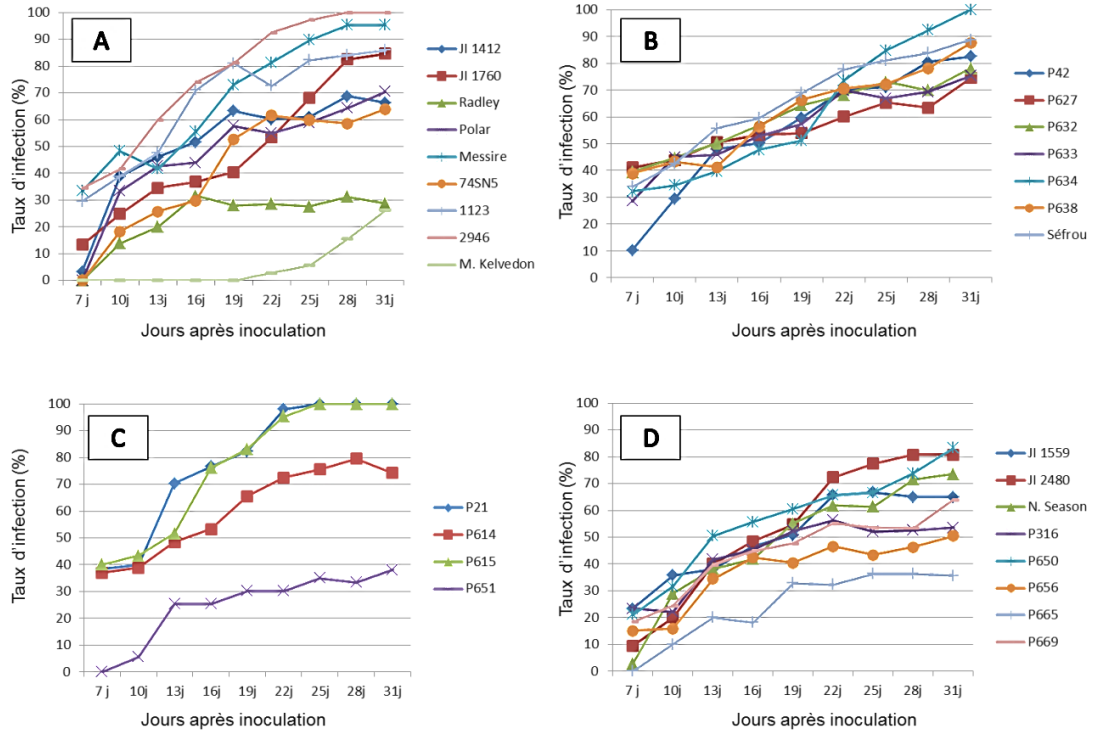
Appendice K

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

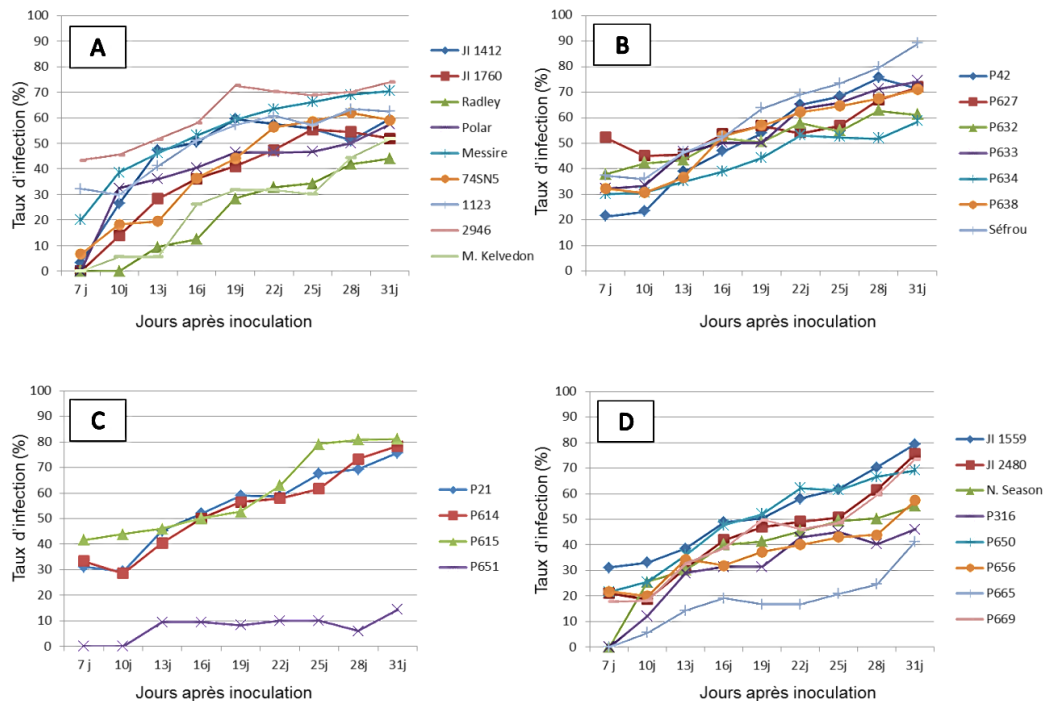


Appendice L1

Evolution des taux d'infection des 28 géotypes inoculés avec la souche R2F42 de *Fop*.

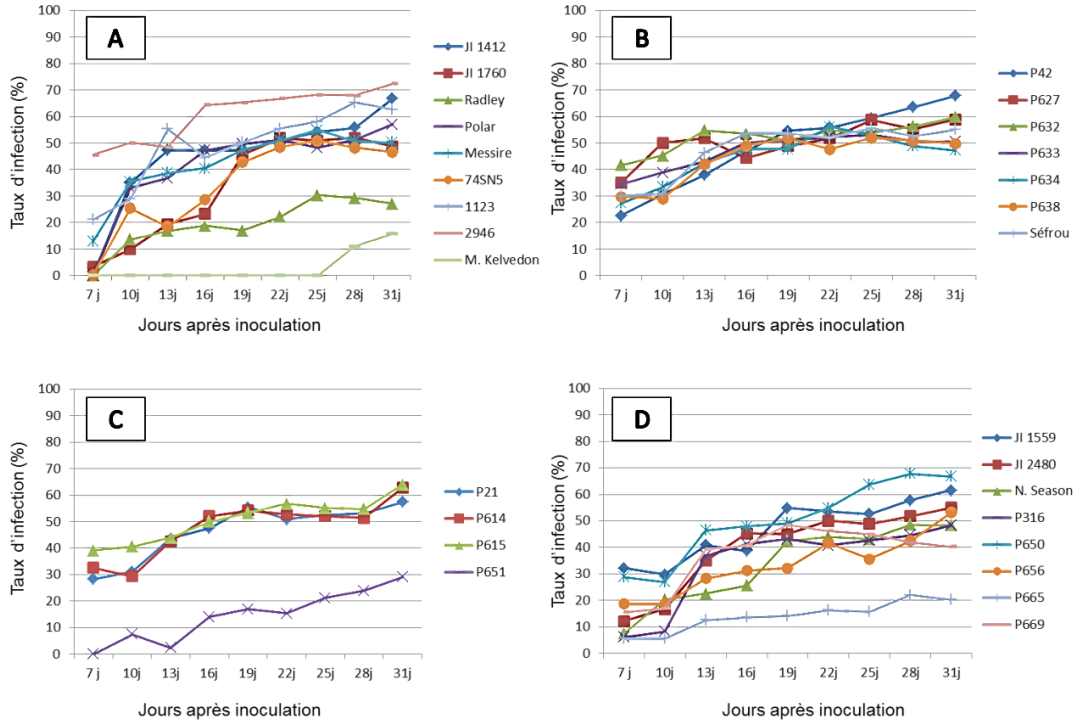


Evolution des taux d'infection des 28 géotypes inoculés avec la souche R1 de *Fop*.

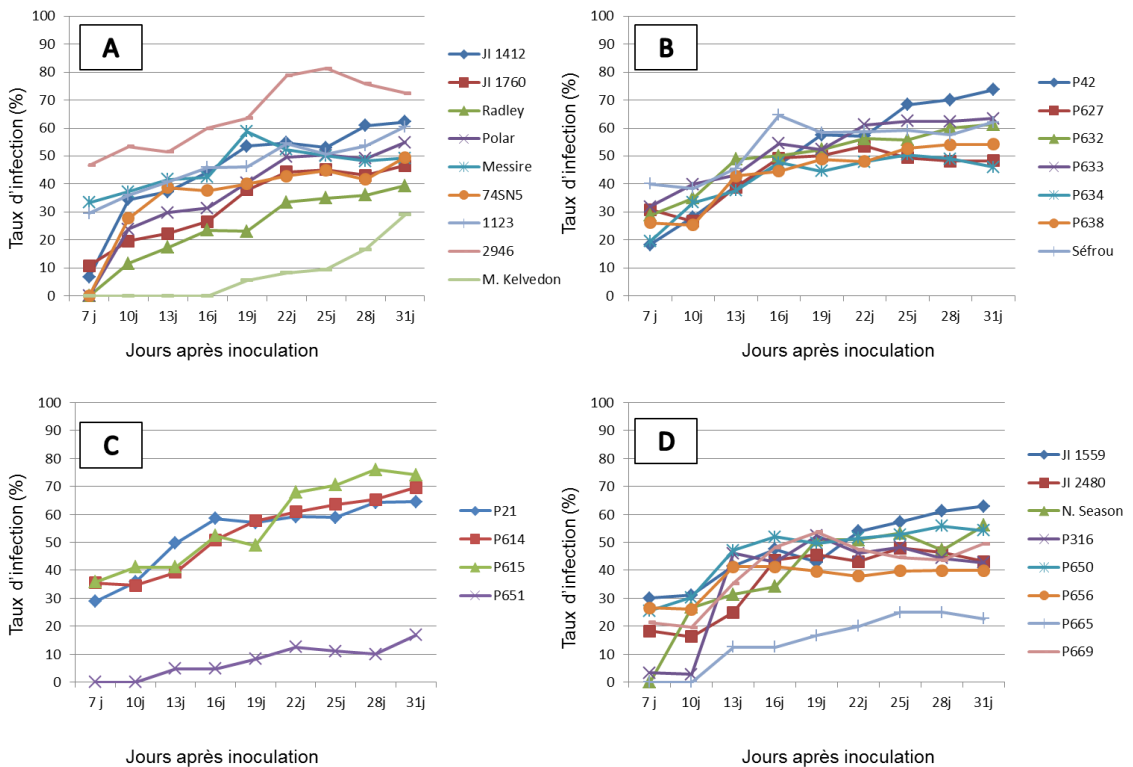


Appendice L2

Evolution des taux d'infection des 28 génotypes inoculés avec la souche Arg1 de *Fop.*

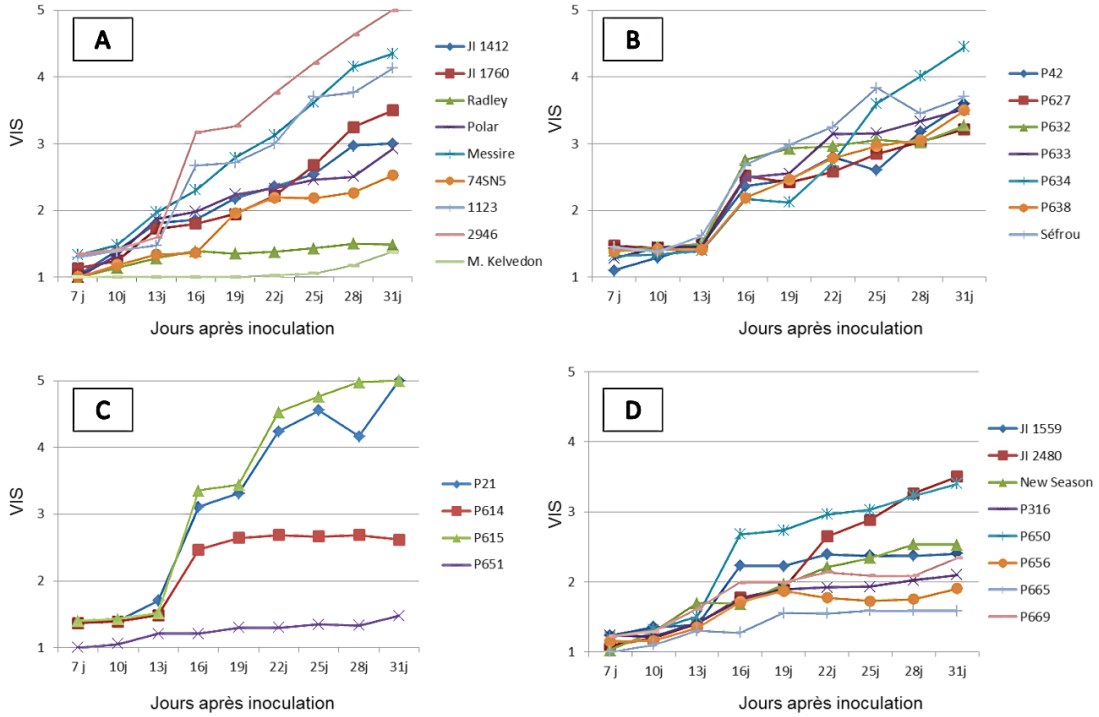


Evolution des taux d'infection des 28 génotypes inoculés avec la souche Arg3 de *Fop.*

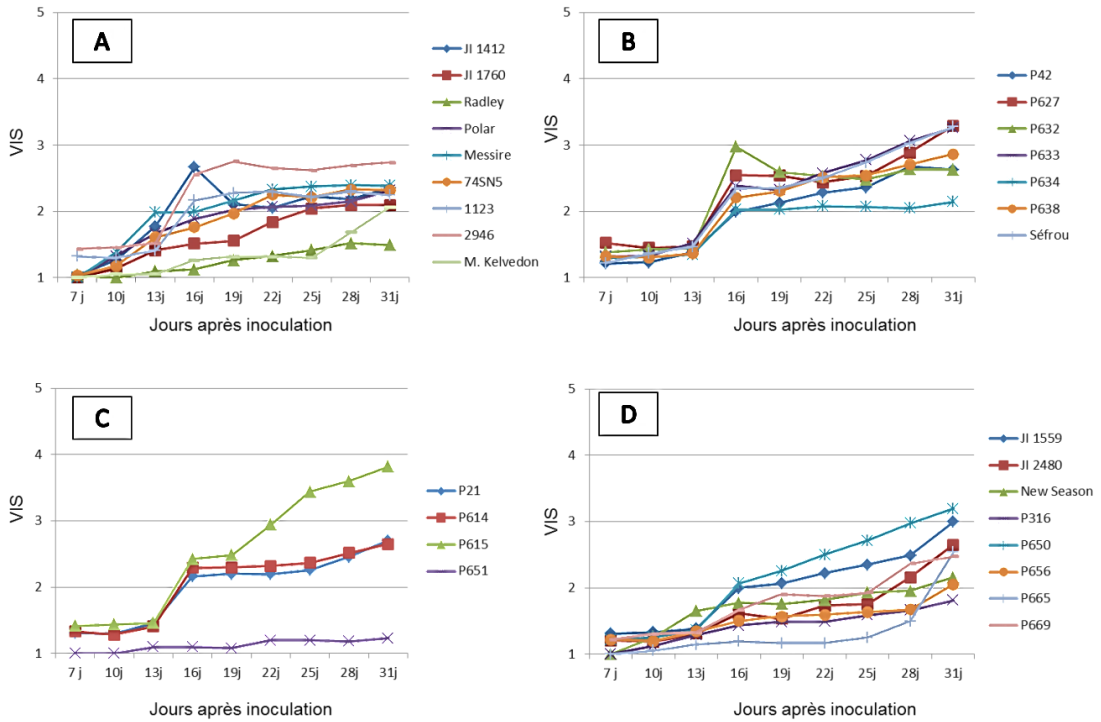


Appendice M1

Evolution des valeurs VIS des 28 génotypes inoculés avec la souche R2F42 de *Fop*.

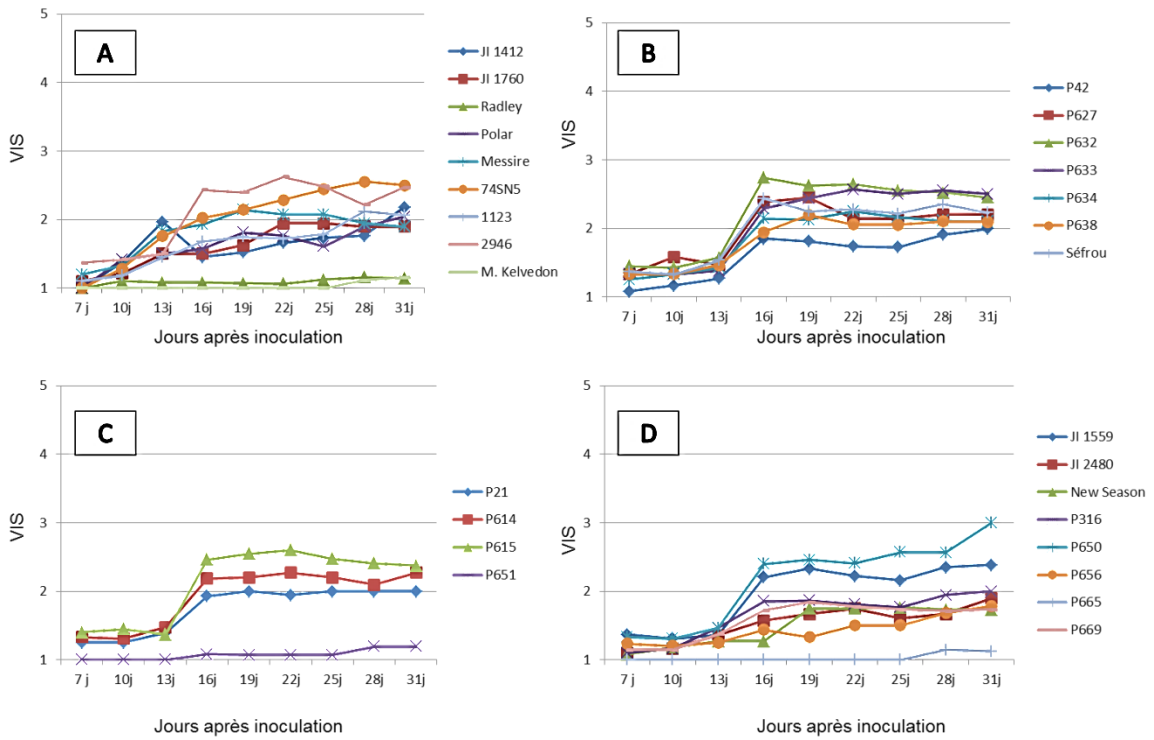


Evolution des valeurs VIS des 28 génotypes inoculés avec la souche R1 de *Fop*.

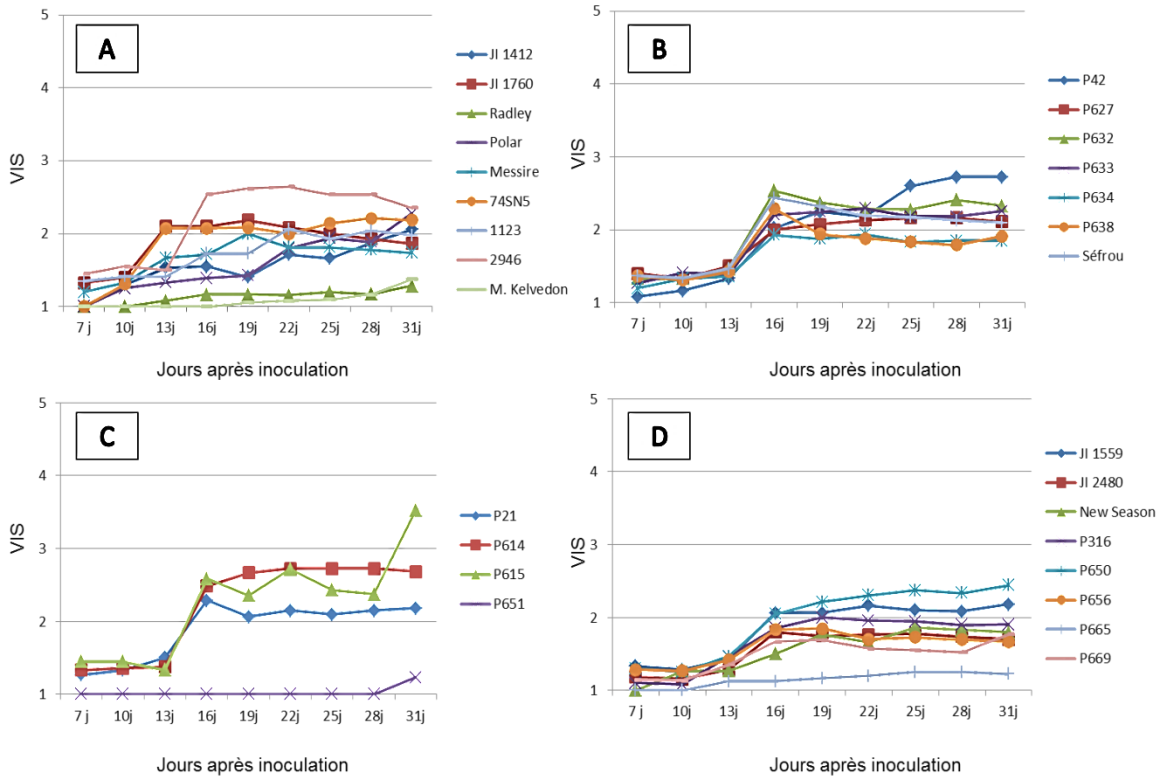


Appendice M2

Evolution des valeurs VIS des 28 génotypes inoculés avec la souche Arg1 de *Fop*.



Evolution des valeurs VIS des 28 génotypes inoculés avec la souche Arg3 de *Fop*.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. FAOSTAT., <http://faostat.fao.org>, (2015).
2. Zohary, D. and Hopf, M., “Domestication of Plants in the Old World”, third ed. Oxford University Press, New York, (2000), p. 316.
3. Weiss, E. and Zohary, D., “The Neolithic southwest Asian founder crops”, *Curr. Anthropol*, 52, (2011), S237 - S254.
4. Smýkal, P., Hýbl, M., Corander, J., Jarkovský, J., Flavell, A.J. and Griga, M., “Genetic diversity and population structure of pea (*Pisum sativum* L.) varieties derived from combined retrotransposon, microsatellite and morphological marker analysis”, *Theor. Appl. Genet.*, 117, (2008), 413 - 424.
5. FAOSTAT., <http://faostat.fao.org>, (2013).
6. FAOSTAT-Agriculture., “Food and agricultural commodities production. Food and agriculture organization”, Rome, (2011).
7. 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.
8. 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.
9. Kraft, JM. and Pflieger, F.L., “Compendium of Pea Diseases”, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, (2001), 67p.

10. Kraft J.M., "Fusarium wilt of peas (a review)". *Agronomie*, 14, (1994), 561 - 567.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Bani M., Rubiales D. and Rispaill 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.
17. Lebeda, A., Švábová, L. and Dostálová, R., "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, (2010), 189 - 196.

18. Smartt, J., "Grain Legumes: Evolution and Genetic Resources", Cambridge University Press, Cambridge, UK, (1990), 379 pp.
19. Erskine, W., Smartt, J. and Muehlbauer, F., "Mimicry of lentil and the domestication of Common Vetch and Grass Pea", *Economic Botany*, 48(3), (1994), 326 - 332.
20. Fourmont, R., « Les variétés de pois (*Pisum sativum*) cultivées en France », INRA, Paris, (1956), 253 pp. + 70 planches.
21. Gibault, G., « Légumineuses, Pois », *In: Histoire des légumes*, Librairie Agricole, (1912), 314 - 322.
22. Theophrastus, "Enquiry into plants", Translated by Arthur Hort, Harvard Univ., Cambridge, MA, (1961), 2 vols.
23. Smartt, J. and Hymowitz, T., "Domestication and Evolution of Grain Legumes. Grain Legume Crops", *In: Summer field*, R.J., Roberts, E.H. (Eds.), (1985), 37 - 72.
24. 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.
25. Cousin, R., "Peas (*Pisum sativum* L.)", *Field Crops Research*, 53, (1997), 111 -130.
26. Brink, M. et Belay, G., « Ressources végétales de l'Afrique tropicale 1. Céréales et légumes secs ». Fondation PROTA, Pays-Bas, (2006), 171 - 177.
27. 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.

28. Bastianelli, D., Grosjean, F., Peyronnet, C., Duparque, M. and Régnier, J. M., « Feeding value of pea (*Pisum sativum* L.) 1. Chemical composition of different categories of pea”, *Animal Science*, 67(3), (1998), 609 - 619.
29. 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.
30. Benoît, M., Deffontaines, J.P. et Lardon S., « Acteurs et territoires locaux. Vers une géoagronomie de l'aménagement », *Collection Savoir-Faire*, INRA, (2006).
31. Smýkal, P., e Coyne, C., Redden, R. and Maxted, N., “Peas”, In: *Genetic and Genomic Resources of Grain Legume Improvement*, Elsevier, (2013), 41 - 80.
32. Smýkal, P., Kenicer, G., Flavell, A.J., Corander, J., Kosterin, O., Redden, R.J., Ford, R., Coyne, C.J., Maxted, N., Ambrose, M.J. and Ellis, N.T.H., “Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the genus *Pisum*”, *Plant Genet. Resources*, 9, (2011), 4 – 18.
33. 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.
34. Ambrose, M., “Garden pea”, In: Prohens J., Nuez, F. (eds) *Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Umbelliferae, and Solanaceae*, Springer, New York, (2008), 3 - 26.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
 38. 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. *psis*”, *Plant Pathology*, 44, (1995), 98 - 108.
 39. 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.
 40. Rubiales, D., Fondevilla, S., Chen, W., Gentzbittel, L., Higgins, T.J.V., Castillejo, M.A., Singh, K.B. and Risipail, N., “Achievements and challenges in legume breeding for pest and disease resistance”, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, (2015), 195 - 236.
 41. 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.
 42. 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.
 43. 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.

44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. Fondevilla, S., Carver, T.L.W., 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.
48. 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.
49. 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), 127p.
50. 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.
51. 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.
52. Gordon, T.R. and Martyn, R.D., "The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*", *Ann. Rev. Phytopathol.*, 35, (1997), 111 - 128.

53. 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., (2010), 2 (1).
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. Agrios, G.N., "Plant pathology", 5th edition. Department of plant pathology. University of Florida, Elsevier Academic Press, (2005), 948 p.
59. Armstrong, G. M. and Armstrong, J. K., "Formae specials 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.
60. 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.
61. Messiaen, C. M. et Cassini, R., « Systématique des *Fusarium* », Annales de Phytopathologie, 3, (1968), 386 - 454.

62. Booth, C., "The genus *Fusarium*", Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, (1971), 237 p.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. 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.

71. Michielse, C.B. and Rep, M., "Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*", Mol. Plant Pathol., 10, (2009), 311 - 324.
72. 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.
73. Rispaill, 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.
74. 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.
75. Vidhyasekaran, P., "Fungal Pathogenesis in Plants and Crops: Molecular Biology and Host Defense mechanisms", CRC Press, Boca Raton, (2008), 536p.
76. Beckman, C.H., "The Nature of Wilt Diseases of Plants", Am. Phytopath. Soc., Saint-Paul, Minnesota, USA, (1987), 175p.
77. Beckman, C.H., Verdier, P.A. and Mueller, W.C., "A system of defense in depth provided by vascular parenchyma cells of tomato in response to vascular infection with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, race 1", Physiological and Molecular Plant Pathology, 34, (1989), 227 - 239.
78. 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.
79. Dixon, R.A., "Natural products and plant disease resistance", Nature, 411, (2001), 843-847.

80. Mert-Turk, F., "Phytoalexins: Defense or just a response to stress?", *Journal of Cell and Molecular Biology*, 1, (2002), 1 - 6.
81. Lamb, C. and Dixon, R.A., "The oxidative burst in plant disease resistance", *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, (1997), 251 - 275.
82. Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M. and Rodriguez-Palenzuela, P., "Plant defense peptides, Biopolymers", *Peptide Science*, 47, (1998), 479-491.
83. 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.
84. Wang, H.X. and Ng, T.B., "An antifungal protein from the pea *Pisum sativum* var. *arvense* Poir", *Peptides*, 27, (2006), 1732 - 1737.
85. 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.
86. 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.
87. Bohnert, H. U., Fudal, W., Dioh, 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.
88. 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.

89. Sherbakoff, C. D., "Breeding for resistance to *Fusarium* and *Verticillium* wilts", Bot. Rev., 15, (1949), 377 - 422.
90. Jones, F.R. and Linford, M.B., "Pea Disease Survey in Wisconsin" Wisc. Agric. Exp. Sta. Res. Bull. WI, USA, 64, (1925), 3 p.
91. Linford, M.B., "A *Fusarium* Wilt of Peas in Wisconsin", Wisc. Agric. Exp. Sta. Res. Bull. WI, USA, 85, (1928), 43 p.
92. 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.
93. Snyder, W.C., "A new vascular *Fusarium* wilt disease of peas", Science, 77, (1933), 327.
94. Haglund, W.A., "Fusarium wilts", In: Compendium of Pea Diseases (DJ Hagedorn, ed). Am. Phytopath. Soc., Saint-Paul, MN, USA, (1984), 22 - 24.
95. Haglund, W.A. and Kraft, J.M., "*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 5", Phytopathology, 60, (1970), 1861 - 1862.
96. Haglund, W.A. and Kraft, J.M., "*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 6: Occurrence and distribution", Phytopathology, 69, (1979), 818 - 820.
97. 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), 187p.
98. Hagedorn, D.J., "Handbook of pea diseases", Madison, Wisconsin, USA, (1991), 25p.
99. Hagedorn, D.J., "Compendium of pea diseases", American Phytopathol. Society, Saint-Paul, Minnesota, USA, (1984), 57p.

100. Guimaraes, E.P., Ruane, J., Scherf, B.D., Sonnino, A. and Dargie, J.D., "Marker-Assisted Selection, Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish", FAO, Rome, (2007), 494p.
101. 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.
102. Duniway, J.M., "Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil", Phytopathology, 92, (2002), 1337 - 1343.
103. 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 OEPP/EPPO, 30, (2000), 243 - 246.
104. Pal, K.K. and McSpadden-Gardener, B., "Biological control of plant pathogens. The plant health instructor", Biological Control, (2006), 25 p.
105. 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.
106. 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.
107. 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.
108. 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.

109. 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.
110. Haglund, W.A., "A rapid method for inoculating pea seedlings with *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*", *Plant Disease*, 73 (6), (1989), 457 - 458.
111. Raeder, U. and Broda, P., "Rapid preparation of DNA from filamentous fungi", *Letters of Applied Microbiology*, 1, (1985), 17 - 20.
112. Waalwijk, C., Dekoning, J.R.A., Baayen, R.P. and Gams, W., "Discordant groupings of *Fusarium* spp. from sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlaminia* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences", *Mycologia*, 88, (1996), 361-368.
113. O'donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P.R., Crous, P. W., Glenn, A., Riley, R., Zitomer, N.C., Colyer, P., Waalwijk, C., van der Lee, T., Moretti, A., Kang, S., Kim, H.S., Geiser, D.M., Juba, J.H., Baayenn, R.P., Cromey, M.G., Bithel, S., Sutton, D.A., Skovgaard, K., Ploetz, R., Kistler, H.C., Elliott, M., Davis, M. and Sarver, B.A.J., "A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex", *Fungal Genet. Biol.*, 46, (2009), 936 - 948.
114. 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, (1983), 365 - 90.
115. 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.

116. 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.
117. 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.
118. Teng, P.S. and James, W.C., "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, (2002), 25 - 38.
119. Lepoivre, P., « Les mécanismes de résistance et la spécificité parasitaire », *In* : *Phytopathologie*, 1ère édition, De Boeck et Larcier, Bruxelles, Belgique, (2003), 161 - 191.
120. Atta, S., « Etude de la variabilité génétique pour la fixation et la remobilisation de l'azote chez le pois (*Pisum sativum* L.). Incidence sur la teneur en protéines des grains », Thèse de doctorat en Sciences biologiques et fondamentales appliquées, université de Rennes I, (1995), 135 p.
121. Mani, F., Hannachi, C., Rezgui, S. et Bouzlama, M., « Comportement agronomique d'une collection de pois *Pisum sativum* L. », *Tropicultura*, 25 (4), (2007), 248 - 252.
122. Mikic, A., Mihailovic, V., Dimitrijevic, M., Petrovic, S., Cupina B., Dordevic, V., Kosev, V., Milosevic, B., Jovanovic, Z. and Milovac, Z., "Evaluation of seed yield and seed yield components in red–yellow (*Pisum fulvum*) and Ethiopian (*Pisum abyssinicum*) peas", *Genet. Resour. Crop Evol.*, 60, (2013), 629 – 638.
123. Skovgaard, K., Bodker, L. and Rosendahl, S., "Population structure and pathogenicity of members of the *Fusarium oxysporum* complex isolated from

soil and root necrosis of pea (*Pisum sativum* L.)", FEMS Microbiology Ecology, 42, (2002), 367 - 374.

- 124.** Leslie, J.F. and. Summerell, B.A., "The *Fusarium* Laboratory Manual", 1st edition, Blackwell Publishing, Iowa, USA, (2006).