

*Université de Blida*  
*Institut d'Agronomie*

---

*Thèse*

---

En vue de l'obtention du Diplôme de Magister en *Phytopathologie*.

*Sujet*

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA  
POURRITURE RACINAIRE ET DU  
FLETRISSEMENT VASCULAIRE DE LA  
LENTILLE (*Lens culinaris* L.) CAUSEES  
RESPECTIVEMENT PAR *Fusarium solani* (Mart) Appel  
& Wr. ET *Fusarium oxysporum* f.sp.lentis Vasd  
and Brin.

Présentée par Mr: *SETTI BENALI*

et soutenue le:

Devant le jury:

Président

Mr MINH ND

Professeur.

Directeur

Mr BOUZNAD Z.

Maitre de conférences.

Examineurs:

Mr SABAOU N.

Professeur.

Mr BELLAL M

Maitre de conférences.

Mr KERKOU M.

Chargé de cours.



32-630-270-1

Republique Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

*Université de Blida*  
*Institut d'Agronomie*

---

*Thèse*

---

En vue de l'obtention du Diplôme de Magister en *Phytopathologie*.

*Sujet*

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA  
POURRITURE RACINAIRE ET DU  
FLETRISSEMENT VASCULAIRE DE LA  
LENTILLE (*Lens culinaris* L.) CAUSEES  
RESPECTIVEMENT PAR *Fusarium solani* (Mart) Appel  
& Wr. ET *Fusarium oxysporum* f.sp.lentis Vasd  
and Brin.

Présentée par Mr: *SETTI BENALI*

et soutenue le:

Devant le jury:

<u>Président</u>	Mr MINH ND	Professeur.
<u>Directeur</u>	Mr BOUZNAD Z.	Maitre de conférences.
<u>Examineurs:</u>	Mr SABAOU N.	Professeur.
	Mr BELLAL M	Maitre de conférences.
	Mr KERKOU M.	Chargé de cours.

# Dédicaces

A mes parents

A mes sœurs

A mon frère

A toute ma famille et mes amis

Je dédie ce travail

## LISTE DES FIGURES

	PAGES
Figure 1: Dispositif pour l'étude du comportement variétal	30
Figure 2: Dispositif expérimental du test de la spécificité parasitaire	32
Figure 3: Influence des milieux de culture sur la croissance mycelienne de quatre isolats de <i>F.solani</i>	53
Figure 4: Influence de la température sur la croissance mycelienne de quatre isolats de <i>F.solani</i>	55
Figure 5: Influence de la lumière et de l'obscurité sur la croissance mycelienne de quatre isolats de <i>F.solani</i> .	56
Figure 6: Influence du pH sur la croissance mycelienne quatre isolats de <i>F.solani</i>	56
Figure7: Influence de l'humidité relative sur la croissance mycelienne de quatre isolats de <i>F.solani</i>	57
Figure 8 a: Schéma des zymogrammes des estérases chez quatre isolats de <i>F.solani</i> et un isolat de <i>F.o.l</i>	60
Figure8 b: Schéma des zymogrammes des malates déhydrogénases chez quatre isolats de <i>F.solani</i> et un isolat de <i>F.o.l</i>	60
Figure9: Le pourcentage du degré d'attaque (%IM) de quatre isolats de <i>F.solani</i> et un isolat de <i>F.o.l</i> sur 11 variétés de lentille	65
Figure 10: Le pourcentage de reisolement (%RP) de quatre isolats de <i>F.solani</i> et un isolat de <i>F.o.l</i> à partir de 11 variétés de lentille	65
Figure 11: Taux des différents enzymes oxydases et des polyphénols	70

## LISTE DES TABLEAUX

	PAGES
Tableau 1: Composition biochimique de quelques légumineuses alimentaires	05
Tableau 2: Zones de culture de lentille en Algérie en 1983	06
Tableau 3: Les différentes variétés cultivées en Algérie entre 1990-1994	08
Tableau 4: Nombre d'échantillons analysés dans la région de Tissemsilt et Tiaret	19
Tableau 5: Les différents isolats de <i>Fusarium solani</i> et <i>F.oxysporum</i> testés pour leur pathogénécité	21
Tableau 6: Obtention de différents gammes de pH	25
Tableau 7: Obtention de différentes gammes d'humidité relatives	25
Tableau 8: Les différentes variétés utilisées dans le test de comportement variétal	30
Tableau 9: Les différentes espèces utilisées dans le test de la spécificité parasitaire	31
Tableau 10: Résultats de comparaisons de deux méthodes d'analyse de la mycoflore associées aux semences de lentille de la variété Syrie 229 en % de semences infectées	36
Tableau 11: Fréquence (% de grains infectés) de champignons associés aux semences de lentille par la méthode d'Agar test	38
Tableau 12: Fréquence d'isolement des agents pathogènes associés à la culture de la lentille dans les régions de Tiaret et Tissemsilt	42
Tableau 13: Pathogénie comparée de quelques isolats de <i>F. solani</i> et <i>F.o.l</i>	46
Tableau 14: Aspect cultural des colonies de différents isolats sur milieu PDA en lumière alternée	50
Tableau 15: Mensuration des microconidies de quatre isolats de <i>F.solani</i> et un isolat de <i>F.o.l</i>	52
Tableau 16: Mensuration des macroconidies de quatre isolats de <i>F.solani</i> et un isolat de <i>F.o.l</i>	52
Tableau 17: Présentation du nombre de bandes électrophorétiques de quatre isolats de <i>F.solani</i> et un isolat de <i>F.o.l</i>	60
Tableau 18: Pourcentage d'attaque de quelques espèces inoculées par quatre isolats de <i>F.solani</i> et un isolat de <i>F.o.l</i>	67
Tableau 19: Pourcentage de reisolement (%RP) de l'agent pathogène à partir de quelques espèces	67

## SOMMAIRE

	PAGES
<b>INTRODUCTION.</b>	01
<b>I-Généralités sur la culture de la lentille</b>	04
1.1-Importance des légumes secs en Algérie	04
1.2-Situation de la culture de la lentille en Algerie	06
1.3-Les variétés cultivées en Algerie	07
1.4- Aspects phytosanitaires	09
1.4.1-Agent de flétrissement de la lentille :	09
1.4.1.1-- <i>Fusarium oxysporum f.sp.lentis</i> Vasd and Brin	09
1.4.1.1.1- Importance de la maladie	09
1.4.1.1.2- Symptômes de la maladie	10
1.4.1.1.3-Agent pathogène	10
1.4.1.1.4- Méthode de lutte	11
1.4.2-Les agents de pourriture	12
1.4.2.1- <i>Fusarium solani</i> (Mart )Appel & Wr.	12
1.4.2.1.1- Symptômes	13
1.4.2.1.2-Agent pathogène	13
1.4.2.1.3-Gamme d'hôtes	14
1.4.2.1.4-Moyens de lutte	14
1.4.2.2- <i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn	14
1.4.2.2.1- Symptômes	15
1.4.2.2.2-Agent pathogène	15
1.4.2.2.3- Moyens de lutte	15
1.4.2.3- <i>Rhizoctonia bataticola</i> (Taub .)Bull:	15
1.4.2.3.1-Symptômes	16
1.4.2.3.2-Agent pathogène	16
1.4.2.3.3- Moyens de lutte	16
1.5- Objet de notre travail	17
<b>II-Materiel et méthodes</b>	18
2.1-Méthode d'étude de la mycoflore associée aux semences	18

	PAGES
2.1.1- Echantillons	18
2.1.2- Choix de la méthode d'analyse	18
2.1.1.1 - Méthode d'agar test	18
2.1.1.2 - Méthode de Blotter test	18
2.1.2- Méthode d'analyse retenue pour cette étude	18
2.2-Inventaire et importance des agents associés aux symptômes de flétrissement et pourritures racinaires.	19
2.2.1-Choix des régions et parcelles d'études	19
2.2.1.1-Echantillonnage	19
2.2.1.2-Analyse au laboratoire	19
2.3-Pathogénie comparée des isolats de <i>Fusarium solani</i> et un isolat de <i>F.o.l</i>	20
2.3.1-Obtention du matériel fongique	20
2.3.2-Obtention du matériel végétal	20
2.3.3-Substrat utilisé	21
2.3.4- Méthode d'inoculation	21
2.3.5-Evaluation de la pathogénie	22
2.3.6-Reisolement de l'agent pathogène	22
2.4- Caractérisation morphologique et culturale des isolats	22
2.4.1-Dimension et types de conidies	22
2.4.2- Aspect cultural de la croissance des colonies	23
2.5-Etude in vitro de quelques caractères biologiques de quatre isolats de <i>F.solani</i>	23
2.5.1-Action de milieux de culture	24
2.5.2-Action de la température	24
2.5.3-Action du pH	24
2.5.4-Action de l'humidité relative	25
2.5.5-Action de la lumière et de l'obscurité	26
2.5.6-Méthode d'évaluation de la croissance et de la sporulation du champignon	26
2.5.7- Répétition et traitement statistique	26
2.6-Méthode d'étude électrophorétique de deux systèmes enzymatiques	27
2.6.1-Matériel fongique utilisé	27

	<b>PAGES</b>
2.6.2- Conditions de culture pour la préparation du mycélium	27
2.6.3- Préparation du mycelium	27
2.6.4-Extraction de protéines	27
2.6.5-Analyse enzymatique proprement dite	28
2.6.5.1-Préparation des échantillons	28
2.6.5.2-Composition de gels de polyacrylamide en conditions natives PAGE	28
2.6.5.3- Dépôts des échantillons	28
2.6.5.4- Révélation des systèmes enzymatiques	28
2.7-Méthode d'étude du comportement variétale	30
2.8-Méthode d'étude de la spécificité parasitaire des quatre isolats de <i>F.solani</i> et un isolat de <i>F.o.lentis</i>	31
2.9-Méthode d'évaluation des oxydases et des polyphenols	32
2.9.1-Matériel végétal	33
2.9.2- Préparation de l'extrait enzymatique	33
2.9.3- Dosage des oxydases par spectrophotométrie	33
2.9.4-Méthode de dosage des oxydases	34
2.9.5-Méthode de dosage des polyphenols	34
<b>3-Résultats et discussion</b>	<b>36</b>
3.1 Analyse de la mycoflore totale	36
3.1.1-Fréquence des principaux champignons	36
3.1.2-Taux d'infection par le genre <i>Fusarium</i> .	37
3.1.3-Discussion et conclusion	38
3.2-Importance des agents de pourritures et de trachéomycoses	41
3.2.1-Résultats	41
3.2.2-Discussion et conclusion	42
3.3-Pathogénie comparée de 10 isolats de <i>Fusarium spp.</i>	45
3.3.1-Résultats	45
3.3.2- Discussion et conclusion	47
3.4-Characterisation morphologique des quatre isolats de <i>F.solani</i> et un isolat de <i>F.o.l</i>	48
3.4.1-Variation cultural et morphologique	48
3.4.1.1-Aspect cultural de la croissance des colonies	49

	<b>PAGES</b>
3.4.1.2-Dimension et types de conidies	50
3.4.2-Discussion et conclusion	52
3.5-Comportement in vitro des quatre isolats de <i>F.solani</i>	54
3.5.1-Action du milieu de culture sur la croissance et la sporulation	54
3.5.2-Action de la température sur la croissance et la sporulation	55
3.5.3-Action de la lumière et de l'obscurité sur la croissance et la sporulation	56
3.5.4-Action du pH sur la croissance et la sporulation	57
3.5.5-Influence de l'humidité relative sur la croissance et la sporulation	57
3.5.6-Discussion et conclusion	58
3.6- Etude du polymorphisme isoenzymatique de isolats de <i>F.solani</i> et un isolat de <i>F.o.l.</i> : Analyse des estérases et des malates dehydrogénases	60
3.6.1- Les esterases	60
3.6.2- Les malates deshydrogenases	61
3.6.3-Discussion et conclusion	61
3.7- Etude de la comportement variétale et la spécificité parasitaire des différents isolats	63
3.7.1-Comportement des variétés vis à vis des isolats de <i>F. solani</i> et <i>F.o.l</i>	63
3.7.2-Spécificité parasitaire de <i>F. solani</i> et de <i>F.o.l</i>	66
3.7.3-Discussion et conclusion	68
3.8-Importances de polyphenols et de certaines oxydases dans le mécanisme de résistance	70
3.8.1-Résultats	70
3.8.2-Discussion et conclusion	71
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>74</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>77</b>
<b>ANNEXE</b>	<b>86</b>

## INTRODUCTION

Les légumineuses occupent une place importante dans les systèmes de cultures caractérisés par une pluviométrie moyenne de 350 - 450 mm. Ce rôle est lié d'une part à l'enrichissement du sol en matières azotées, et d'autre part à leur importance économique et nutritionnelle (ANONYME, 1988). En outre, les légumineuses alimentaires sont utilisées pour valoriser les situations peu favorables.

En Algérie, malgré la forte augmentation des emblavures de la culture, les rendements sont restés bas. Ils ne dépassent guère les quatre quintaux par hectare.

Cette faible production est due à une pluviométrie globalement déficitaire, et irrégulièrement répartie dans le temps et dans l'espace. A cela s'ajoutent un travail du sol mal réalisé, une fertilisation très peu maîtrisée, une prolifération de mauvaises herbes et un mauvais état des semences.

Les études effectuées en Algérie, sur la pathologie des légumineuses ont été focalisées surtout sur le pois chiche, la fève et à un degré moins sur le pois. Très peu d'études ont été consacrées à la pathologie de la lentille.

En effet, au problème de l'anthracnose, s'ajoute un fléau, celui des maladies causées par les agents telluriques et particulièrement celles entraînant les pourritures racinaires ou le flétrissement ou les deux manifestations à la fois constituant, un complexe de flétrissement et de pourriture racinaire appelé communément "Wilt and Root Rot disease" due un ensemble d'agents pathogènes telluriques.

Ce problème a été signalé pour la première fois dans la région de Dahmouni (Wilaya de Tiaret) en 1989 où des symptômes de jaunissement et de flétrissements ont été notés (BOUZNAD, Communication personnelle).

Ailleurs, cette maladie a attiré l'attention de beaucoup de chercheurs à travers le monde, vue les dégâts occasionnés à cette culture d'une part et aux problèmes liés aux moyens de lutte contre cette maladie d'autre part (KHOURI, 1974, HANOUNIK, 1979, BELLAR, 1984, EL AHMED et MOUSSLI, 1987).

En effet, la caractérisation des espèces de *Fusarium* causant ces types de symptômes a fait l'objet de nombreuses études qui vont de la caractérisation

classique comme la mensuration des spores, la forme des macroconidies, la présence ou l'absence de microconidies et des chlamydo-spores, la coloration des colonies ainsi que l'étude de la pathogénéicité des isolats de *Fusarium* en les confrontant à des variétés réputées sensibles (MESSIAEN et CASSINI, 1968; BOOTH, 1971).

Cependant, ces mêmes critères demeurent insuffisants pour distinguer les différents isolats, races ou formes spéciales d'une même espèce, raison pour laquelle des identifications biochimiques demeurent une nécessité absolue.

En effet, les travaux concernant cet aspect ont suivi le développement de la biochimie. Après l'échec obtenu avec l'étude des acides aminés, la richesse en protéines et particulièrement le dosage des activités enzymatiques font l'objet de nombreuses recherches (GUEZLANE, 1976, LINDE et al, 1990; LINNEE et BURDON, 1990).

Les conclusions varient suivant le genre considéré et l'objectif visé: séparation des espèces, des formes spéciales ou des races, et bien entendu en fonction des techniques utilisées.

MEYER (1969) analyse l'activité enzymatique et particulièrement les estérases de quatre isolats de *F.oxysporum f.sp. melonis* et de cinq souches de *F.oxysporum f.sp. aleadis*. Il observe de grandes fluctuations entre les différents isolats.

GILL et POWELL (1968) n'ont relevé que de faible différence dans l'analyse des protéines de trois espèces de *Phytophthora*: *P.cactorum*, *P.fragariae*, *P.sojae*.

CLARE et ZENTMEYER (1966), sont arrivés aux mêmes conclusions avec les isolats de *Pythium*.

En revanche, CHANG (1926) chez les *Neurospora*, CLARE (1963) chez les *Phytophthora*, MACKO et STAHRMAN (1967) chez les *Puccinia*, ont montré l'existence de variations protéiques et enzymatiques au sein des espèces comparées.

Ces résultats parfois discordants nous ont incité à entreprendre l'étude des potentialités enzymatiques des isolats de *Fusarium solani* isolés de la lentille et d'un isolat de *F.oxysporum*, deux espèces très proches sur le plan morphologique.

Concernant les deux systèmes enzymatiques choisis dans cette étude à savoir les estérases et les malates déshydrogénases, en effet, ces dernières ont fait l'objet de nombreux travaux du fait de leur importance polymorphique au niveau des champignons phytopathogènes (SIMCOX et al. 1992).

Le rôle des principales oxydases ainsi que des polyphenols impliqués dans le phénomène de la résistance des plantes vis à vis des agents pathogènes ont fait l'objet de notre étude.

En effet, ce rôle a été l'objet de nombreux travaux dans le monde. Déjà en 1954, ANDRE rapporte que la résistance ou la sensibilité des plantes hôtes à des attaques par divers agents pathogènes, dépend essentiellement de la nature des réactions biochimiques qui se dérouleront au sein des plantes hôtes. Concernant les polyphenols, il est bien connu depuis longtemps que leur biosynthèse va s'accélérer dans les plantes après infection par des agents pathogènes. (FARKAS et KIRALY, 1962; KOSUGE, 1969; FRIEND, 1979).

Concernant les oxydases, si le rôle de certains d'entre elles était déjà connu depuis un certain temps, bon nombre d'entre elles, leur rôle demeure non encore élucidé. C'est le cas notamment de la catalase et de l'acide ascorbique oxydase (HAMMERSCHMIDT et al, 1982; BAZZALO et al, 1985; ABBATISTA et al.1988).

## I-GENERALITES SUR LA CULTURE DE LA LENTILLE:

### 1.1- IMPORTANCE DES LÉGUMES SECS EN ALGÉRIE:

Les légumes secs occupent une place particulière dans l'agroéconomie mondiale, ceci pour leur large consommation et leur caractéristique agronomique particulière. Leur capacité d'adaptation à des conditions pédoclimatiques difficiles et leur faible exigence culturale, ont fait que ces cultures sont très répandues de par le monde.

En Algérie, les légumineuses ne sont développées qu'à partir de 1929, durant cette année de crise économique, les surfaces cultivées ont atteint plus de 90.000 ha (ANONYME, 1986).

La répartition géographique de la culture des légumineuses se situe principalement dans les régions de l'ouest du pays, particulièrement dans les wilayas de Tiaret, Tissemsilt, Sidi Bel Abbès, Mostaganem qui détiennent à elles seules 60% des superficies emblavées, mais ne participent que pour 46.5 % dans la production nationale (LAMAMRI, 1992).

Les principales espèces cultivées sont :

Lentille: *Lens culinaris* L.

Pois chiche: *Cicer arietinum* L.

Fève: *Vicia Faba* L.

Haricot: *Phaseolus vulgaris*.L.

Pois: *Pisum sativum* L.

En effet, ces légumineuses présentent une importance tout à fait particulière pour l'agriculture, en raison des caractéristiques biologiques des racines dans la fixation de l'azote atmosphériques par les nodosités bactériennes.

Les raisons agronomiques et nutritionnelles justifient encore l'intérêt accordé à ces légumineuses.

Sur le plan agronomique, le remplacement de la jachère nue par les légumes secs dans le système céréale - jachère représente un gain de surfaces cultivées et un apport important qui contribue à élever le niveau de la fertilité des sols.

Du point de vue nutritionnel, la richesse des légumineuses en protéines permet de corriger dans une certaine mesure les carences en protéines animales ainsi que le déséquilibre alimentaire des populations qui ont tendance à se nourrir exclusivement de céréales. D'autant plus que la présence de la lysine principal acide aminé qui se trouve en quantité très importante dans les légumes secs, contribue à l'équilibre de la ration alimentaire. Ainsi l'association céréales -légumes secs aurait une valeur proche à celle d'une protéine animale (ANTHELEME et al, 1978).

La composition biochimique globale des légumineuses alimentaires (tableau 1), montre une forte teneur en glucide (50 à 58 % ), en protéines (20 à 25 % ) et en vitamines (B1, B2 et C).

**Tableau 1 :Composition biochimique de quelques légumineuses alimentaires**

Espèces	Fèves sèches	Pois chiches	Lentilles	Pois ronds	Haricots secs
Composition (g)/100g sec					
Protéines	25.0	19.2	23.7	22.5	22.1
Matières grasses	1.8	6.8	1.3	1.8	1.7
Glucides	49.7	56.1	57.4	56.6	57.6
Cendres	3.0	3.0	2.2	2.6	3.4
Celluloses	9.9	3.4	3.2	5.5	4.4
Eau	10.6	11.5	12.2	11.0	11.0
Nb de cal /100 g	354	376	351	346	341
Vitamines en (mg)					
C		-	3	2	-
B1	0.54	0.40	0.50	0.77	0.54
B2	0.29	0.18	0.20	0.20	0.18

Source :Anonyme (b),1992

## 1.2-SITUATION DE LA CULTURE DE LENTILLE EN ALGERIE:

La lentille (*Lens culinaris* L), appartient à la famille des légumineuses, sous famille des Papilionacées, a été publiée pour la première fois par Medikus en 1787.

La lentille est une culture très ancienne en Egypte, au Sud de l' Europe et en Asie de l' ouest. Elle s'est ensuite étendue à l'Europe du Nord, à l' Inde à la Chine en Amérique du Nord.

Actuellement, elle est cultivée dans la plupart des régions subtropicales, des régions tempérées chaudes et des régions d'altitude sous les tropiques (LAMAMRI, 1992).

La lentille présente des caractéristiques agronomiques considérables, comparables aux autres légumineuses où elle occupe une place importante.

La lentille peu exigeante sur la nature du sol, préfère des sols légers et calcaires. Si celle-ci est assez résistante à la sécheresse et aux températures élevées, elle est en revanche assez sensible au froid (ANONYME,1987). Les zones potentielles pour cette culture telles que proposées par l' Institut de Grandes Cultures (I.T.G.C.) sont présentés dans le tableau ci dessous.

Tableau 2: Zones de culture de lentille en Algérie en 1983:

Zones	Superficies (ha)	Productions (Qx)
Tiaret	5850	11687
Sidi bel-Abbes	3920	4124
Saida	860	210
Mostaganem	650	2400
Chlef	500	1650
Medea	7100	2040
Bouira	500	750
Skikda	130	238

Source: Source d'information DVP (MAP)  
in MOHAMEDI, 1989

### 1.3-VARIETES CULTIVEES EN ALGERIE:

L'amélioration de la lentille, telle qu'elle a été menée en Algérie pendant la période coloniale, avait pour but de développer les aptitudes agronomiques des variétés locales (LAUMONT et CHEVASSUS, 1956). Cette approche de sélection de la lentille devait répondre aux exigences du marché métropolitain.

Parmi les variétés de lentille sélectionnées, retenues à l'époque en Algérie (LAUMONT et CHEVASSUS, 1956), on peut citer:

\*- Large blonde métropole :

Origine: -Isolée en France en 1942

Aptitudes: -Végétation très vigoureuse avec une très bonne fertilité (2 à 3 gousses par inflorescences graines chacune );

Très bonne qualité culinaire;

Destination: -Commerce intérieur et exportation;

Station de multiplicatrice: Batna.

\*-Large verte d'Algérie

Origine: Obtenue en 1950 dans une population massale d'un hybride naturel (L petite verte xLarge blonde), trouvée à Tiaret en 1943.

Aptitudes: Végétation très rigoureuse avec une très bonne fertilité (2 à 3 gousses par inflorescence, 2 graines par gousse);

Bonne qualité culinaire;

Destination: Commerce intérieur et exportation.

Station multiplicatrice: Ain temouchent.

\*-Petite blanche de Syrie :

Origine: -Sélectionnée en 1952 en Syrie.

Aptitude: Végétation très vigoureuse, très fertile (2 à 3 gousses par inflorescence, 2 graines par gousse);

Très précoce, résistante au mildiou, sensible à la rouille;

Bonne qualité culinaire;

Destination: Marche intérieur;

Station multiplicatrice: Setif.

Récemment, l'I.T.G.C. s'est lancé dans la voie de la multiplication des semences de lentille avec les principales variétés, et particulièrement celles qui ont montré des performances sur le plan agronomique (résistance aux différents stress et capacité productive) ainsi que sur le plan nutritionnel (tableau 3).

**Tableau 3: Nombre de variétés multipliées et les surfaces emblavées durant la période 1990-1994**

**Unité: Ha**

<b>Campagne</b> <b>Variétés</b>	<b>1989/90</b>	<b>1990/91</b>	<b>1991/92</b>	<b>1992/93</b>	<b>1993/94</b>
<b>SYRIE 229</b>	0.15	0.25	00	00	00
<b>SETIF 618</b>	0.2	0.	0.15	00	00
<b>BALKAN755</b>	00	0.5	2.5	00	00
<b>LB CHILI</b>	0.15	2	00	00	00
<b>METROPOLE</b>	3.65	1.08	10	36.5	00
<b>P.B DAHRA</b>	00	00	0.5	0.2	0.18
<b>NEL 468</b>	0.15	0.1	0.5	0.2	00

Source : Anonyme, 1995

Ces superficies restent très faibles pour pouvoir couvrir les superficies à emblaver en semences de reproduction, pour réduire l'utilisation de semences ordinaires et les substituer par des semences certifiées.

## 1.4- ASPECTS PHYTOSANITAIRES:

La lentille peut être affectée par plus de 20 maladies dont plusieurs sont provoquées par des agents telluriques (KHARE,1981), qui causent principalement les affections racinaires et caulinaires entraînant, soit des pourritures ou nécroses du système racinaires soit un flétrissement, ou encore les deux symptômes en même temps (KHARE,1979).

En effet ce complexe inclut de nombreux agents, dont principalement: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum f.sp. lentis* et *Rhizoctonia solani* ( SHUKLA et al,1972; SHATLA et al,1974; KANNAYAN, 1976; KHARE, 1980).

### 1.4.1-AGENTS DU FLETRISSEMENT DE LA LENTILLE:

#### 1.4.1.1- *Fusarium oxysporum f.sp.lentis* Vasd and Brin (*F.o.l.*):

##### 1.4.1.1.1-Importance de la maladie:

La Fusariose vasculaire causée par le *F.o.l.* est une maladie très importante. Elle a une distribution géographique très étendue (Afrique du Sud, Espagne, Inde, Syrie, Pakistan ) (SHUKLA et al, 1972; KANNAYAN, 1976; 1972KHARE, 1980).

Cette maladie a été rapportée pour la première fois en Algérie en 1987 par BOUZNAD (communication personnelle).

Les pertes occasionnées par cet agent sont très importantes ou' ils ont atteint en Inde les 50%. (KHARE, 1980).

En Syrie, cette maladie a entraîné des pertes de 12% de la production de la lentille (BAYA'A et al, 1986).

Quant au stade d'apparition de la maladie, KANNAIYAN et NENE (1976), notent qu'en Inde, le flétrissement apparaît en deux stades, le premier au stade plantule "seedling wilt", surgissant 1 à 3 semaines après le semis, celui ci cause plus de dégâts que le flétrissement tardive "Adult plant wilt", qui apparaît généralement vers le stade de la floraison ou la fructification.

#### 1.4.1.1.2-Symptômes de la maladie:

Plusieurs auteurs ont décrit les symptômes de cette maladie (ERWIN, 1958, GUPTA et al, 1986, VAN RHEENEN, 1989).

Le flétrissement typique peut être identifié à deux phases du cycle de la culture:

Stade plantule: Les plantules affectées ne montrent pas de pourriture à la surface, cependant, une section verticale au niveau du collet montre une coloration noirâtre des tissus vasculaires. Chez les variétés sensibles, la mortalité survient généralement dix jours après leur émergence. Leurs vaisseaux montrent un brunissement interne des extrémités racinaires (NEMA et KHARE, 1973; NENE et REDDY, 1978).

Stade adulte (six semaines au plus après le semis ): Les plantes attaquées présentent un flétrissement typique, caractérisé par un brunissement des vaisseaux qui est souvent continu et s'étend à quelques millimètres au dessous du collet. Les plantes affectées ne révèlent aucune pourriture racinaire (NENE et REDDY, 1978).

#### 1.4.1.1.3 - Agent pathogène:

Le *Fusarium oxysporum f.sp. lentis* est un champignon imparfait de la famille des moniliales. C'est un agent tellurique transmissible par semences, qui, en absence de l'hôte, peut survivre dans le sol pendant une longue période. Le champignon attaque le système racinaire et passe à travers l'épiderme pour s'acheminer vers les vaisseaux du xylème où il produit abondamment des conidies (GRAWAL et al, 1984, GUPTA et al, 1986). Le champignon, une fois installé dans la tige, se développe pour entraîner une obstruction des tissus vasculaires et un jaunissement puis un dessèchement des feuilles basales. Un brunissement des vaisseaux, aboutit nécessairement au flétrissement total de la plante (GREWAL et al, 1984, SMITHSON et al, 1985; GUPTA et al, 1986).

Sur milieu nutritif et particulièrement le PDA (Potato Dextro Agar), le champignon développe un mycelium blanchâtre et cotonneux en vieille culture. Les hyphes sont séptés et excessivement ramifiés. Les microconidies unicellulaires mesurent (4-14µm x2-4µm). Ces conidies portés sur des conidiophores courts et simples, sont rarement bicellulaires.

Les macroconidies pluricellulaires: (3-6 cellules), sont à parois minces avec une cellule de base et une cellule de sommet pointue, leurs dimensions varient de 20 à 35  $\mu\text{m}$  x 2 à 5  $\mu\text{m}$ .

- Les chlamydospores sont unicellulaires à paroi épaisse, rondes et produites de manière intercalaire ou terminale sur les filaments mycéliens les plus âgés ou sur les macroconidies. Leurs mensurations sont de l'ordre de 8.8 x 8  $\mu\text{m}$  ( SMITHSON et al, 1985; GUPTA et al, 1986, BENIWAL et al, 1993).

La température optimale pour la croissance du champignon et pour l'infection se situe aux alentours de 25°C. Quant à l'influence de la nature du sol sur la sévérité de la maladie, les sols alcalins semblent exercer une influence défavorable sur la croissance et la sporulation ( KANNAIYAN et NENE, 1976; GUPTA et al, 1978). De même, la sévérité de cet agent semble être favorisée par la présence d'autres agents notamment, les nématodes et particulièrement les *Meloidogyne spp* (HAWARE et NENE, 1984; MANI et SETHI, 1984).

#### 1.4.1.1.4-Méthode de lutte:

Le *F.oxysporum* est un agent tellurique qui a une capacité de survie extraordinaire, car il peut se maintenir dans les débris de culture pendant plusieurs années. C'est un agent systémique et est transmis par semences. Il n'est donc pas facile de prévoir l'infestation, ni pouvoir éradiquer le pathogène une fois établi (ANONYME, 1978; HAWARE et NENE, 1978).

**1.4.1.1.4.1-Traitement chimique.** L'emploi des fongicides sur les lots de semences peut être un moyen efficace pour contrôler la maladie en améliorant l'émergence des plantules.

Des travaux réalisés sur le *Fusarium. oxysporum.f.sp. ciceris*, ont montré que le Benlate T(30% Benomyl +30% Thirame )à 0.015% élimine complètement l'agent pathogène à partir des semences (GUPTA et KOTASTHANE, 1978; HAWARE et al, 1981; JIMENEZ-DIAZ et al, 1989).

SHUKLA et al (1981), ont suggéré l'emploi de la Bavistin (Carbendazime) à 0.5 g/kg pour diminuer l'incidence de l'agent pathogène sur la germination.

#### 1.4.1.1.4.2-Résistance variétale :

Les cultivars résistants constituent la meilleure solution pour contrôler cette maladie et aussi la plus efficace contre tous les agents du complexe de flétrissement et pourriture racinaire de lentille (ROBERT et KRAFT, 1971; KANNAIYAN et NENE, 1976). Mais l'apparition de nouvelles races physiologiques, casse à chaque fois la résistance d'une variété sélectionnée. A titre d'exemple, on mentionne en Inde, la présence de sept races physiologiques (KANNAIYAN et NENE, 1978). Ces mêmes auteurs ont pu déterminé plusieurs cultivars résistants entres autres: JL80,

Pusa 3 et Pant 234.

#### 1.4.1.1.4.3- Autres moyens de lutte:

Une fois cet agent installé dans le sol, le champignon peut infecter d'autres espèces telles que le pois chiche, la fève et l'haricot sans pour autant provoquer des symptômes, ce qui rend impossible son contrôle par les rotations culturales (KANNAIYAN et REDDY, 1978; NENE et REDDY, 1987)

KOTSTHAME et AGRAWAL (1978), ont montré qu'un semis tardif peut réduire l'effet de cette maladie en augmentant le pourcentage de l'émergence de plantules. Des amendements azotés réduisent considérablement le nombre de chlamydospores et favorisent la lyse des conidies.

D'autre part, le choix du sol peut être aussi un moyen de prévention; c'est ainsi par exemple, que les sols légers sont plus suppressifs de la maladie que les sols limono- sableux (BOORSAMA, 1978; SATYAPRASAD et RAO, 1982).

### 1.4.2-LES AGENTS DE POURRITURE:

#### 1.4.2.1-Fusarium solani (Mart )Appel &Wr:

Le *Fusarium solani* responsable de la pourriture racinaire de la lentille et du pois chiche associé à d'autres *Fusarium spp* a été identifié par KRAFT (1969) comme le *Fusarium solani f.sp. pisi*. Mais il peut exister une autre forme spéciale de *F. solani* qui cause des symptômes similaires sur lentille que celle causé par le *F. solani f.sp. pisi*, avec des degrés d'attaques faibles. Ce champignon est plus commun en Inde que le *Fusarium oxysporum*.

*f.sp.lentis*(GREWAL et al,1974) et aux USA (WESTERLUND et al,1974). C'est un agent qui est impliqué dans le complexe de pourriture racinaire. Il constitue le principal problème du pois chiche et de la lentille dans de nombreux pays (ALAVAREZ et BRINER,1987).

#### 1.4.2.1.1-Symptômes :

Ce champignon attaque le collet et les racines, se traduisant par divers symptômes tel un flétrissement partiel ou total de la plante (TRAPERO-CASAS et JIMENEZ-DIAZ, 1981).

Dans certains cas, les parties aériennes peuvent présenter des symptômes similaires à ceux causés par le *F.o.l.* et se traduisent par un jaunissement prématuré des feuilles basales.

Quant au système racinaire, celui ci présente, soit des lésions racinaires ou des nécroses localisés ou encore une pourriture noire (WESTERLUND et al,1974). Des études faites en Espagne sur le complexe de pourriture des racines du pois chiche, ont montré que ces symptômes sont induits soit par le *F. solani*, soit par le *F. eumarti* soit par les deux en association (TRAPERO-CASAS et JIMENEZ-DIAZ,1985).

#### 1.4.2.1.2-Agent pathogène :

Cette espèce extrêmement polyphage et très ubiquiste, se rencontre sur un grand nombre de plantes cultivées et spontanées (MESSIAEN et LAFON, 1970).

Ce champignon imparfait est caractérisé par la formation des microconidies produites sur des conidiophores allongés en forme de fausse tête. Ces microconidies sont petites cylindroïdes, arrondies aux deux extrémités, unicellulaires ou parfois divisées par une cloison.

Les macroconidies présentent des extrémités plus arrondies que celles du *F.oxysporum*. Les cloisons sont fréquemment en nombre de trois, mais ce nombre peut varier de 2 à 4. Les chlamydo-spores simples ou doubles, terminales ou intercalaires, ont une forme ovale à sphérique à paroi lisse (TRAPERO-CASAS, 1983; ALAVAREZ et BRINER,1987).

Le champignon est tellurique, et peut se conserver dans le sol pendant plusieurs années en l'absence de l'hôte. Il est transmis par semences (ERSKINE et al, 1990), mais selon certains auteurs, cette transmission reste faible (WESTERLUND et al, 1974).

Quant à l'influence de la nature du sol sur le comportement de ce champignon, celui-ci est beaucoup plus redoutable dans les sols sableux avec une humidité élevée (NENE et REDDY, 1987). La température optimale de croissance se situe entre 25 et 30°C (VAN RHEENEN et al, 1989).

#### 1.4.2.13- Gamme d'hôtes:

Le *F.solani* f.sp. *pisi* est responsable des pourritures ou nécroses racinaires sur de nombreuses légumineuses (pois chiche, fève, petit pois, haricot) mais sur d'autres espèces, les symptômes se limitent à des lésions locales au niveau des racines.

**1.4.2.1.4-Moyens de lutte:** Le traitement préventif des semences avec certains fongicides tels que le Benomyl ou le Thirame peut réduire l'incidence de la maladie en augmentant l'émergence des plantules et retarder ainsi le développement d'une épidémie (SHUKLA et al, 1981; JIMENEZ-DIAZ et TRAPERO-CASAS, 1985).

La recherche et l'emploi des cultivars résistants restera la meilleure méthode de lutte contre cette maladie (KANNAIYAN, 1974; KAISER et HORNER, 1980).

Pour cela, quelques variétés ont été développées et qui présentent une résistance multiple au complexe de pourriture racinaire (AGRAWAL et al, 1976; KANNAIYAN et NENE, 1976; MAS et al, 1988)

**1.4.2.2-Rhizoctonia solani Kuhn:** Agent de pourriture racinaire molle, appelée communément "Wet root rot", entraîne des pertes considérables sur lentille. Cette maladie a été signalée dans de nombreux pays et particulièrement en Inde (AGRAWAL et al, 1976; KANNAIYAN et NENE, 1976), en Egypte (OMAR et al, 1988), en Iran (KAISER et HORNER, 1980) et en Amérique (SHINKAND et al, 1983).

#### 1.4.2.2.1-Symptômes:

La maladie apparait à la fois au stade plantule et au stade de plante adulte dans des sols humides. Cependant, dans les deux cas, les symptômes sur les parties aériennes, consistent en un jaunissement avec un flétrissement des feuilles de la base et brunissement de la tige principale. Le système racinaire quant à lui, une fois affecté, présente une coloration rouge brun avec une constriction des vaisseaux du collet (SHUKLA et al,1972; KANNAIYAN et NENE,1973; SHATLA et al,1974).

**1.4.2.2.2-Agent pathogène:** *R. solani* est un pathogène primitif qui peut passer facilement à la phase saprophytique dans les débris des végétaux. Il persiste dans le sol sous forme de sclérotés ou de mycélium qui sont responsables de l'infection primaire. Il est aussi transmis par des semences. La survie des sclérotés une fois dans les sols humides, peut aller jusqu'à cinq ans (LUCAS et al,1985).

La température optimale de croissance du champignon se situe entre 25 et 30°C (VAN RHENEEN et al,1989) et une humidité du sol, allant de 50 à 80% (NENE et REDDY,1987).

**1.4.2.2.3-Moyens de lutte:** L'emploi de certains fongicides à large spectre tel que le formaldéhyde en fumigation du sol, peut rendre inerte l'activité des sclérotés.

L'emploi du traitement préventif des semences par le Thirame ou Captane diminue la gravité de la maladie (QAUISER et ABU,1986).

D'autres techniques, surtout culturales peuvent être pratiquées; comme un semis bien aéré et un enfouissement des chaumes après les récoltes (LUCAS et al, 1986).

Par ailleurs, des résultats encourageants ont été signalés par l'emploi de certains cultivars de lentilles tels que les cultivars: JL80, Pusa 3 et Pan 234 (AGRAWAL et al,1976; KANNAIYAN et NENE,1976).

#### 1.4.2.3-*Rhizoctonia bataticola* (Taub.)Butl.

Tel que rapporté par KHARE(1981), SAXENA et KHARE (1988), le *R.bataticola* (*Macrophomina phaseolina* ) est un agent de pourriture sèche des racines rencontré dans plusieurs régions sous différentes conditions climatiques sèches ou

#### 1.4.2.3.1-Symptômes:

Ils se manifestent généralement au stade floraison -maturité. Les plantes attaquées, montrent un dessèchement des feuilles supérieures qui évolue par la suite en un dessèchement total de la plante.

Les symptômes caractéristiques s'observent surtout sur la partie souterraine, celle-ci se dessèche et montre des éclatements de l'écorce. Les racines attaquées prennent une couleur bleue cendre et des sclérotés noirs de taille et de forme variable apparaissent aussi bien à la surface des racines qu' à l'intérieur (NENE et al,1978; HAWARE,1988).

**1.4.2.3.2- Agent pathogène:** *R.bataticola* croît de manière inter ou intracellulaire et envahit les cellules corticales. Les hyphes colonisent le système vasculaire et développent des sclérotés dans le tissu du xylème (VAN RHEEN et al, 1989). Le mycelium du pathogène est brun clair, les sclérotés sont de forme variable et de diamètre variant entre 36 et 180  $\mu\text{m}$  (TRAPERO-CASAS et JIMENEZ-DIAZ, 1985,a). Le champignon se conserve sous forme de sclérotés dans le sol pendant plusieurs années (HAWARE,1988). Le pathogène est thermophile et sa croissance optimale est obtenue à 35°C.

Les températures élevées et les conditions sèches du sol, spécialement lors de la floraison-formation des gousses, peuvent stimuler le développement de la maladie.

#### 1.4.2.3.3-.Moyens de lutte:

*R. bataticola*, agent très polyphage, persiste dans le sol pendant plusieurs années, ce qui rend les rotations culturales inefficaces. Le traitement des semences avec des fongicides systémiques semble donner de bons résultats (TRAPERO-CASAS et JIMENEZ-DIAZ,1986). Quant à l'emploi de variétés résistantes à cette maladie, aucune variété n'a été mentionnée (DESHKAR et al,1973; in OMAR et al, 1988; AGRAWAL et al,1988).

## 1.5 - OBJET DE NOTRE TRAVAIL :

Si les données bibliographiques déjà citées, nous permettent dire que les agents responsables de flétrissement et de la pourriture racinaire sont assez nombreux, il existe en fait une grande diversité de situations selon les auteurs et les régions étudiées et la plupart des travaux restent limités à l'étude d'un ou de quelques pathogènes considérés comme étant les plus importants.

Concernant cette maladie de la lentille, aucune étude n'a été entreprise jusqu'à présent en Algérie. Cependant, des travaux réalisés dans certaines régions du bassin méditerranéen et de l'Inde, montrent que les principaux agents responsables sont: *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Rhizoctonia solani* et *R. bataticola* (WILSON et BRANDSBERG, 1965; KANNAIYAN et NENE, 1972; KHARE et al, 1985; BAAY'A et al, 1986; AHMED et MOUSSLI, 1987).

Vue la méconnaissance totale de cette maladie en Algérie, nous avons jugé important d'entamer plusieurs approches:

Dans un premier temps, établir un inventaire des agents impliqués dans le complexe "wilt root rot" dans deux zones productrices de la lentille, et identifier la mycoflore associée aux semences, et par la suite tester leur pathogénicité.

Dans un deuxième temps, une étude sur les caractéristiques morphologiques, culturales et physiologiques de quelques isolats de *F. solani*, sera entreprise suivie d'une étude sur le comportement variétal de 11 cultivars. Une étude sur la spécificité parasitaire de quatre isolats de *F. solani* et un isolat de *F. o. l.* a été réalisée.

En dernier lieu, une comparaison électrophorétique pour deux systèmes enzymatiques, à savoir les malates déhydrogénases et les estérases portant sur quatre isolats de *F. solani* et un isolat de *F. o. l.* a été abordée.

Enfin, une approche sera tentée pour comprendre le mécanisme biochimique de la résistance variétale par le dosage de quelques enzymes impliquées dans le mécanisme de la résistance (polyphénoloxydase, peroxydase, catalase et l'acide ascorbique oxydase) ainsi que les polyphénols.

## **II -MATERIELS ET METHODES:**

### **2.1-METHODE D'ETUDE DE LA MYCOFLORE ASSOCIEE AUX SEMENCES DE LENTILLE:**

#### **2.1.1-Echantillons de semence:**

Les semences de lentille utilisées, proviennent de la récolte de la campagne agricole 91-92 de deux parcelles appartenant à une E.A.C. du village Amoura dans la willaya de Tissemsilt, parcelles qui avaient montré des symptômes de flétrissement ainsi que de jaunissement notés en cours de végétation. La principale variété cultivée est Syrie 229.

#### **2.1.2-Choix de la méthode utilisée:**

Un échantillon de 400 graines a été analysé par deux méthodes, à raison de 200 graines pour chaque méthode.

Pour les deux méthodes, les semences sont préalablement désinfectées avec de l'eau de Javel à 10 % pendant 5 mn, suivi de deux lavages successives à l'eau distillée stérile, puis mis à sécher sur papier filtre stérilisé.

##### **2.1.2.1- Méthode d' Agar test:**

L'analyse sanitaire des semences est faite sur un milieu PDA gélosé acidifié avec l'acide lactique 1% en vue d'inhiber la prolifération de colonies bactérienne. Les semences mises en boîtes à raison de 10 graines par boîte, sont incubées à 25°C. La lecture des boîtes est faite après 10 jours.

##### **2.1.2.2- Méthode de Blotter test:**

Les semences à analyser sont placées dans des boîtes de Pétri contenant du papier filtre préalablement stérilisé et imbibé dans l'eau distillée stérile dans lesquelles ont été placées 10 graines dans chaque boîte. Les boîtes sont mises en incubation à 25°C pendant 10 jours avant leur lecture.

## 2.2- INVENTAIRE ET IMPORTANCE EN CULTURES DES AGENTS RESPONSABLES DU COMPLEXE DE FLÉTRISSEMENT ET DE LA POURRITURE RACINAIRE:

### 2.2.1-CHOIX DES REGIONS ET DES PARCELLES:

#### 2.2.1.1-Echantillonnage:

Pour dresser l'inventaire des agents responsables de la maladie de flétrissement et de pourriture racinaire de la lentille, deux régions qui abritent de grandes surfaces de productions de légumineuses ont été choisies à cet effet, à savoir la wilaya de Tissemsilt et la wilaya de Tiaret. Les parcelles appartiennent soit à des E.A.C., soit à des agriculteurs privés, soit prospectés à la station de l'I.T.G.C.

Les caractéristiques des parcelles et des dates de prospections sont consignées dans le tableau 4.

Lors de chaque visite, et au niveau de chaque parcelle, 10 à 15 plants montrant des symptômes de jaunissement, de flétrissement et de pourritures ou des nécroses racinaires, sont prélevés et ramenés au laboratoire pour une analyse ultérieure.

Tableau 4 :Nombre d'échantillons analysés dans la région de Tissemsilt et Tiaret

Région	Zone	Parcelle	Code de la parcelle	Nombre d'échantillons prélevés	Date de prélèvement
Tissemsilt	Ammouri	E.A.C1	TA1	12ab	1990/91
		E.A.C.2	TA2	12Aab	1990/91
	Tasslamt	Parcelle privée	TT1	15Aab	1992/93
		Parcelle privée	TT2	15Ab	1990/91
Tiaret	Sabiine	I.T.G.C.	TS1	15aA	1990/91
		Parcelle privée	TS2	12Ab	1991/93
	Dahmouni	Parcelle privée	TD1	15Aa	1992/93
		Parcelle privée	TD2	12aAb	1992/93

A = Flétrissement  
b = Pourriture racinaire

a = Jaunissement

### 2.2.1.2- Analyse au laboratoire:

#### 2.2.1.2.1- Isolement à partir de tiges et des racines:

Les racines ainsi que les tiges sont lavées à l'eau courante puis désinfectées à l'eau de Javel à 5%, séchées, puis coupées en petits morceaux de 5 à 6 mm de long et placées dans un milieu LDA ( Lentil Dextrose Agar) proposé par MUHLE et al(1983) in (BOJDOVA et SINSKY, 1990) et acidifiée. Les boîtes ainsi préparées sont placées en incubation à 25°C pendant sept jours.

#### 2.2.1.2.2- Identification et purification des espèces:

L'identification des agents pathogènes est faite sur la base de l'observation microscopique. Les clés de détermination utilisées sont celles de BARNETT et HUNTER (1972), TOUSSON et NELSON (1976) et BOOTH( 1977).

Après identification des agents responsables, les isolats sont repiqués aseptiquement sur milieu acidifié. Des repiquages successifs précédés par des observations microscopiques, nous ont permis d'avoir des cultures pures de champignons.

Ces cultures sont ensuite repiquées dans des tubes à essai pour constituer une collection d'isolats devant servir de base aux travaux ultérieurs.

## 2.3- PATHOGENIE COMPAREE DES ISOLATS DE *F. SOLANI* ET UN *F.O.L.*:

### 2.3.1-Obtention du matériel Fongique:

Les isolats de *Fusarium spp* utilisés pour déterminer leur pathogénécite sont présentés dans le tableau ci dessous (tableau 5).

### 2.3.2- Obtention du matériel végétal:

Les graines sont désinfectées à l'eau de Javel à 10 % pendant 3 mn, suivi d'un lavage à l'eau distillée puis un séchage. Les graines ainsi préparées sont mises en pré germination dans des boîtes de Pétri à une température de 25°C. La variété Syrie 229 est retenue pour ce test.

**Tableau.5: Les différents isolats de *F.solani* et de *F.oxysporum* testés pour leur pathogénicité:**

Isolats	Origine	Organe d'isolement
F1	Ammouri	Racines
F2	Ammouri	Racines
F3	Tasslamt	Racines
F4	Tasslamt	Racines
F5	Sabiine	Racines
F6	Sabiine	Tiges
FT	Dahmouni	Racines
F88	ITGC	Semences
FSY	ITGC	Semences
FD	Dahmouni	Racines et tiges

### 2.3.3- Substrat utilisé:

Le substrat utilisé est constitué de deux tiers de sable fin et un tiers du terreau. Le mélange est stérilisé pendant deux heures à une température de 110°C. Le sol stérilisé, est réparti dans des pots préalablement désinfectés à l'eau de Javel.

Les semences déjà désinfectées sont semées à raison de 10 graines par pots. Les pots ainsi préparés sont placés dans une serre climatisée où les conditions de température et d'humidité sont respectivement réglées à 20 -25°C et 60-80 %.

### 2.3.4- Méthode d'inoculation:

La méthode d'inoculation retenue pour ce test est celle utilisée par ALAVAREZ et MORENO (1984), qui consiste à incorporer au sol, un inoculum à base de graines d'avoine (pl.1, fig1). Le principe de cette méthode, consiste à tremper 25 g d'avoine dans chaque erlenmeyer contenant 150 ml d'eau. Les erlens sont ensuite stérilisés à l'autoclave durant 30 mn à 120°C. Après refroidissement, chaque erlens est inoculé avec un explant de mycelium. Le tout est mis en incubation à 25°C pendant 20 jours. L'obtention de l'inoculum par cette méthode permet une inoculation du sol par un mélange de 100g d'inoculum et un kilogramme de substrat.

L'inoculation proprement dite des plants intervient lorsqu'on réalise le semis des graines dans les pots contenant l'inoculum préalablement préparé. Les pots inoculés

sont placés dans une serre climatisée (pl.1, fig 2) où la température et l'humidité sont réglées et qui sont respectivement à 20-25°C et 90-95% HR.

### 2.3.5- Evaluation de la pathogénie:

La sévérité des isolats est exprimée par un indice de la maladie en pour-cent (% I.M.), effectué 45 jours après l'inoculation.

Cet indice est calculé selon le système de notation décrit par TRAPERO et JIMENEZ (1985) déjà utilisé par KRAFT (1969) pour quantifier le flétrissement.

$$(\%IM)/\text{plante} = (\text{Nombre de feuilles atteintes} / \text{Nombre total de feuilles}) \times 100$$

### 2.3.6-Réisolement de l' agent pathogène:

Pour confirmer l'agent inoculé, nous avons cherché à ré isoler les champignons testés à partir de plants atteints.

Le réisolement se fait sur le milieu P.D.A. acidifié. Le pourcentage de réisolement positif (%RP) est exprimé par:

$$\% \text{ RP} = \frac{\text{nombre de fragments colonisés}}{\text{nombre de fragments testés}} \times 100$$

## 2.4- CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ET CULTURALE DES ISOLATS:

### 2.4.1- DIMENSION ET TYPE DE CONIDIES :

La caractérisation des différents isolats obtenus, a été effectuée sur des spores âgés de 6 à 10 jours provenant d'une culture produite sur milieu P.D.A. sous une lumière continue et une température de 25°C.

En général, les observations ont porté sur 100 conidies ( micro et macroconidies) par isolat, à l'aide d'un microscope préalablement étalonné. Toutes les observations sont effectuées au grossissement 40x10.

Des observations microscopiques complémentaires sur le type de conidies, la forme et le nombre de cloisons, ainsi que l'absence ou la présence de chlamydospores permettent une meilleure caractérisation des isolats.

La préparation de la suspension des spores a été réalisée en utilisant de l'eau distillée stérile déjà préconisé par AMEZIANE (1978), par rapport à l'utilisation du bleu de méthylène.

En effet, l'emploi du bleu de méthylène provoque une modification de la taille des spores à cause des phénomènes de pressions exercées sur la paroi fongique en milieu hypertonique.

#### **2.4.2- ASPECT CULTURAL DE LA CROISSANCE DES COLONIES :**

Pour la différenciation des différents isolats de *F. solani* et de *F.o.l.* d'autres caractères macroscopiques ont été pris en considération dans cette étude, à savoir la texture et la couleur de la colonie.

Ces observations ont portés sur des isolats âgés de 10 jours produits sur milieu P.D.A.

#### **2.5- ETUDE IN VITRO DE QUELQUES CARACTERES BIOLOGIQUES DE QUATRE ISOLATS DE *F. SOLANI* :**

Si de nombreuses études sur les caractéristiques biologiques, ont été rapportés pour le *F.o.l.* (SHARMA et al, 1978; KHARE, 1981; BAYA'A et al, 1986), cependant très peu l'a été sur le comportement de *F.solani*. C'est la raison pour laquelle, nous avons jugé opportun d'entamer quelques études pour la première fois en Algérie concernant cet agent.

Concernant les exigences des champignons, de nombreuses espèces fongiques montrent des exigences générales identiques ou très proches, mais chaque espèce ne manifeste une croissance et une sporulation optimale que dans les conditions très particulières. Celles ci sont surtout définies par la qualité et la quantité des éléments nutritifs apportés dans le milieu de culture ( MOREAU, 1953).

Parmi les facteurs les plus importants à étudier sont la température, l'humidité, le pH et la lumière.

### 2.5.1- ACTION DES MILIEUX DE CULTURE :

Pour toutes les espèces fongiques, le choix d'un milieu de culture dépend des exigences nutritionnelles du champignon (NEERGARD, 1973 in BOUZNAD, 1989). Ainsi pour toutes les espèces de *Fusarium spp.*, le problème se pose différemment puisqu'elles peuvent se développer sur une large gamme de milieux qui peuvent être organiques, minéraux ou semi organiques.

Dans cette étude, un certain nombre de milieux de culture communément utilisés en phytopathologie, ont été étudiés:

- Trois milieux organiques: Malt, P.D.A. et L.D.A.
- Deux milieux minéraux : Richard et Czapeck

La composition respective de chacun de ces milieux est présentée en annexe 1.

### 2.5.2- ACTION DE LA TEMPERATURE :

Le développement des quatre isolats de *F. solani* est étudié sur une gamme de températures allant de 5 à 35°C avec un pas de 5°C.

### 2.5.3- ACTION DU PH :

Dans le but d'apprécier l'influence du pH sur la croissance mycélienne et l'aptitude à la sporulation des isolats de *F. solani*, nous avons utilisé comme milieu de culture le PDA avec une large gamme de pH allant de 4.1 à 8.1. Ces tampons sont préparés selon la méthode de SOLMEN (1951) décrite ci après.

La méthode consiste à utiliser un milieu PDA en surfusion, lequel est réparti dans des erlenmeyers de 100 ml en ajoutant des quantités différentes d'acide chlorhydrique titré à 4N ou d'hydroxyde de sodium (4N) selon le cas (tableau 6). Chaque pH obtenu, est contrôlé à l'aide d'un pH-mètre pour une éventuelle correction.

Après autoclavage, les milieux de culture tamponnés sont coulés dans des boîtes de Pétri et ensemencés avec un explant mycelien de 5 mm de diamètre, déposé au centre des boîtes.

Tableau 6 : Obtention des différentes gammes de pH

pH	HCl (4N) ml	NaOH (4N) ml
4.1	2	0
4.6	1	0
5.1	0	0
5.9	0	1
6.8	0	3
7.1	0	4
8.1	0	5

Source: SOLMEN, 1951

#### 2.5.4- ACTION DE L' HUMIDITE RELATIVE :

Les différents degrés d'humidité, sont également obtenus selon la méthode de SOLMEN (1951), décrite ci dessous:

Les boîtes de Pétri sont inoculées avec des explantats de champignon de 5mm de diamètre, les boîtes ainsi préparées sont placées sur leur couvercle.

On verse dans le couvercle 7 à 10 ml de solution correspondant à chaque niveau d'humidité et qui sont préparés selon les combinaisons décrites dans le tableau ci dessous (Tableau 7). Les boîtes sont ensuite mises à incuber à une température de 25°C.

Tableau 7: Obtention des différentes gammes d'humidité relative.

Produit	Poids du produit en (g)	Quantité d'eau distillé (ml)	Humidité relative (%)
Chlorure de Na	0	100	100
Chlorure de Na	8	100	95
Chlorure de Na	24	100	84
Chlorure de Na	32	100	80
Hydroxyde de K	30	100	73
Hydroxyde de K	50	100	50
Hydroxyde de K	100	100	14

Source: SOLMEN, 1951

### **2.5.5- ACTION DE LA LUMIÈRE ET DE L' OBSCURITÉ:**

Pour l'étude de l' influence de la lumière et l' obscurité sur la croissance et la sporulation, les champignons sont cultivés sur milieu à base de P.D.A sous les deux conditions suivantes:

- à l' obscurité, à la température de 25°C;
- sous la lumière continue, à la température de 25°C.

### **2.5.6- MÉTHODE D'ÉVALUATION DE LA CROISSANCE ET DE LA SPORULATION DU CHAMPIGNON:**

En effet, il y a deux types de mesures pour apprécier la croissance mycélienne du champignon, soit par la mesure du poids sec ( MARAITRE et al ,1967), soit par la mesure de la croissance linéaire du mycélium qui est la plus retenue ( BREWER, 1960, LEACH, 1962; KHERBANDA et BERNIER, 1980).

Donc nous avons retenu dans notre étude cette dernière méthode.

Ainsi la croissance mycélienne des colonies est déterminée de la manière suivante:

$$L = (D-d)/2$$

L= croissance mycélienne.

D= diamètre de la colonie.

d= diamètre de l' explantat.

Concernant la sporulation, cette dernière a été déterminée par la méthode de KAISER (1972), qui consiste à broyer la culture du champignon âgée de 10 jours dans un erlenmeyer contenant 100 ml d' eau distillée stérile, Après agitation et filtration on procède au comptage des spores à l' aide de la cellule de Malassez.

### **2.5.7- RÉPÉTITION ET TRAITEMENT STATISTIQUE:**

Quatre répétitions sont retenues pour chaque facteur étudié. Les données sont traitées par une analyse de la variance suivie d' une comparaison des moyennes par le test de Newman et Keuls.

## 2.6- METHODE D' ETUDE ELECTROPHORETIQUE DE DEUX SYSTEMES ENZYMATIQUES :

### 2.6.1- Matériel fongique utilisé :

Nous avons utilisé dans cette étude les isolats suivants:

- quatre isolats de *F.solani*: F1,F3,F5 et FT.

-Un isolat de *F.o.l.* FD.

### 2.6.2- Conditions de culture pour la préparation du mycélium :

Pour chaque isolat, un erlenmeyer de 500 ml contenant 250 ml de milieu liquide PDA est ensemencé par des explants prélevé d'une culture jeune âgée de sept jours sur milieu gélosé. L'incubation a lieu à l'obscurité à une température de 20°C, avec une agitation rotative réglée à une vitesse de 100 rpm.

### 2.6.3- Préparation du mycélium :

Après 7 jours de culture, le mycélium de chaque erlenmeyer est séparé du milieu de culture par filtration à travers un tissu de valisière plié en quatre afin de retenir le mycélium. Après des rinçages avec une solution de NaCl à 8% suivi de trois rinçages à l'eau distillée le mycélium est ensuite séché entre deux papiers de Wattman n°1 puis congelé et lyophilisé durant 48h. Le mycélium ainsi préparé sera prêt pour une extraction protéique ultérieure.

### 2.6.4- Extraction des protéines :

100 mg de mycélium lyophilisé sont broyés dans un mortier en présence de l'azote liquide jusqu'à leur réduction en poudre fine. 1 ml de tampon d'extraction est ajouté au broyat: ce tampon ajusté à pH avec HCl (1N) se compose de Tris 10mM d'EDTA (1mM), et du 2 mercaptoéthanol (3mM).

La suspension est versée dans un tube déposé pendant deux heures dans la glace pillée. Elle est ensuite centrifugée à 20000 x g à une température de 4°C pendant 30 mn. Ainsi la préparation est prête pour une analyse enzymatique ultérieure.

### 2.6.5- Analyse enzymatique proprement dite:

La méthode utilisée est celle qui utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de LAEMMELI, basée sur le système d' ORNESTEIN et DAVIS (HAMES et RICHWOOD, 1987).

Elle comporte deux gels superposés (un gel de concentration et un gel de séparation), ce qui permet une bonne séparation des bandes enzymatiques.

Dans notre étude, nous avons utilisé un appareil à migration verticale, qui consiste en une minicuve ( Hoefler scientific instruments), dont les gels de séparation mesurent 7 sur 9 cm et permettent la migration de 10 échantillons.

#### 2.6.5.1- Préparation des échantillons :

100 µl de solution protéique sont additionnés à 20 µl d'une solution marqueur à base de glycérol à 50% et du bleu de bromophenol à 0.1% (annexe 2). Après centrifugation à 12000x g et une température de 4°C pendant 20 mn, la solution est aussitôt déposée pour une séparation électrophorétique.

#### 2.6.5.2- Composition des gels de polyacrylamide en plaque en conditions natives PAGE:

Le gel de séparation est à une concentration finale de 7.5% d' acrylamide et le gel de concentration à 4 %. Le protocole de préparation est mentionné en annexe 3 et 4.

#### 2.6.5.3- Dépôt des échantillons :

20 µl de la solution protéique ainsi préparée, sont déposés dans des puits de la cuve. La cuve est ensuite remplie avec le tampon Tris glycerine, pH8.3. L'électrophorèse est conduite sous un ampérage de 20 mA. La température de la cuve est maintenue à 5°C.

#### 2.6.5.4- Révélation des systèmes enzymatiques:

Les protocoles retenus pour la révélation des estérases et des malates déshydrogénases (MDH) sont ceux décrits par SICILIONO et SHOW (1976), et modifiés pour les estérases.

##### 2.6.5.4.1-Les estérases:

Les estérases sont des enzymes d'hydrolyse des esters. On distingue trois groupes d'estérases chez les organismes vivants: Les arylestérases qui hydrolysent les esters aromatiques, les alystérases agissant sur les esters aliphatiques et les cholinestérases qui scindent les esters d'acetylcholine.

Dans notre cas, seules les alystérases, essentiellement les acylestérases qui sont détectées selon la méthode retenue. Le protocole de révélation est présenté en annexe 5.

##### 2.6.5.4.2-Les malates déshydrogénases ( MDH):

Les malates déshydrogénases forment un groupe d'oxydoréductases. Elles catalysent au niveau des mitochondries l'oxydation du malate en oxaloacétate qui est intégré dans le cycle de Krebs. Leur rôle est donc très important dans les phénomènes respiratoires. Le protocole de révélation de ce système enzymatique est présenté en annexe 6.

#### 2.7- METHODE D'ETUDE DU COMPORTEMENT VARIATALE

En pratique phytopathologique, la connaissance de la réaction variétale est généralement mise en évidence par la confrontation d'isolats avec une collection de variétés.

Parmi les variétés testées, certaines sont cultivées depuis longtemps en Algérie, d'autres par contre viennent d'être introduites par l'I.T.G.C.pour des études de comportement et d'adaptation. Ces variétés sont consignées dans le tableau ci dessous:

Tableau 8: Les différents variétés utilisées

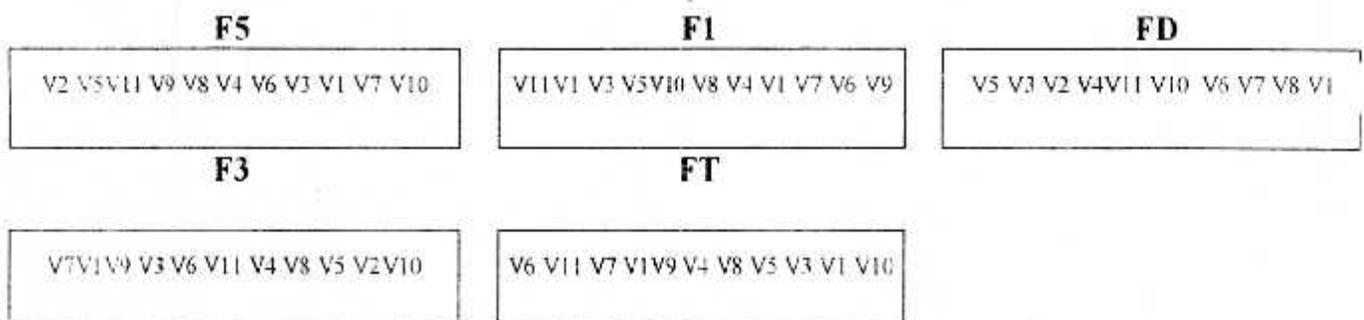
Variétés introduites	ILL4400 ILL8 ILL16 LV141 F86-16L F84-19L LV149A 76TA124
Variétés locales	METROPOLE BALKAN 775 SYRIE 229

L'expérim

ntation est conduite selon le dispositif expérimental schématisé ci dessous ( fig 1).

Le nombre de répétitions retenu pour cet essai est de cinq à raison de 10 plants par pot.

**Fig 1: Dispositif expérimental pour l'étude de la réaction variétale.**



**Variétés de lentille :de V1 à V11**

### 2.7.1.1- Evaluation de la sensibilité variétale:

L'évaluation de la sévérité de la maladie, exprimée par indice de maladie ou le degré d'attaque (en pour-cent) est effectuée 45 jours après inoculation. Le nombre de feuilles montrant les symptômes de flétrissement ou de jaunissement, est noté pour chaque plante:

$$(\%IM)/\text{plante} = (\text{Nombre de feuilles atteintes} / \text{Nombre total de feuilles}) \times 100$$

### 2.7.1.2-Réisolement de l' agent responsable:

Nous avons cherché à réisoler le *F.o.l.* au niveau de la base des tiges et *F.solani* au niveau des racines. Le réisolement de l'agent pathogène se fait sur milieu à base de P.D.A. acidifié. Le pourcentage de réisolement positif (%RP) est exprimé par:

$$\% \text{ RP} = \frac{\text{nombre de fragments colonisés}}{\text{nombre de fragments testés}} \times 100$$

### 2.7.1.3- Analyse statistique:

Le test de Newman- Keuls nous permet de classer les variétés selon les paramètres calculés à savoir, l'indice de la maladie (% IM) et le pourcentage de réisolement (%RP).

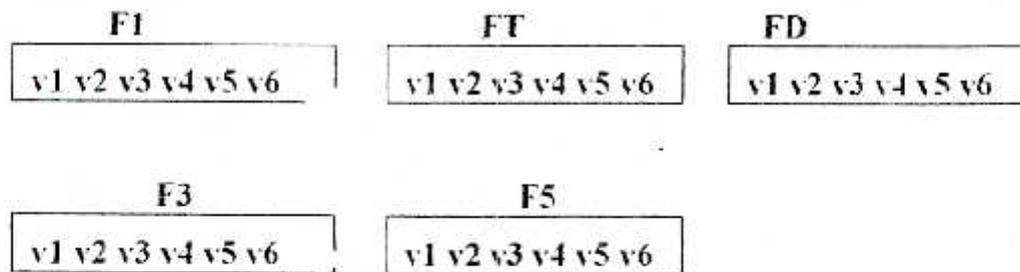
## 2.8- METHODE D' ETUDE DE LA SPECIFICITE PARASITAIRE DE QUATRE ISOLATS DE *F.SOLANI* ET UN ISOLAT DE *F.O.L.*

Dans cette étude, nous avons procédé à des inoculations artificielles selon le dispositif présenté ci dessous (fig 2). Chaque isolat est inoculée sur toutes les plantes hôtes. Les espèces et variétés choisies sont présentés dans le tableau ci dessous. La préparation de l'essai, préparation des semences, du sol, inoculation, évaluation de la pathogénie est similaire à celle décrite au paragraphe 2.3.

Tableau 9: Les différentes espèces et variétés utilisées dans le test de la spécificité parasitaire.

Espèce	Variétés
<i>Cicer arietinum</i>	ILC 482
<i>Lens esculanta</i>	Syrie 229
<i>Pisum sativum</i>	Onward
<i>Vicia faba</i>	Picardie
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Princesse
<i>Triticum durum</i>	Mexicali
<i>Lycopersicum esculentum</i>	Marmande

Fig 2 : Dispositif expérimental du test de la spécificité parasitaire



Espèces et variétés : de V1 à V6

## 2.9- METHODE D'EVALUATION DES OXYDASES ET DES POLYPHENOLS:

Le rôle des principales oxydases et des polyphénols impliqués dans le phénomène de résistance des plantes vis à vis de l'infection de l'agent pathogène a été recherché par la mesure de l'activité enzymatique.

En effet, ce rôle a été l'objet de nombreux travaux dans le monde. Déjà en 1954, ANDRE, rapporte que la résistance ou la sensibilité des plantes hôtes à des attaques par différents agents pathogènes, dépend essentiellement de la nature des réactions biochimiques qui se dérouleront au sein des plantes hôtes.

Cependant, de nombreuses controverses demeurent quant au rôle exact des substances particulièrement, les catalases et acide ascorbique oxydase (VIDA SAKHARAN et REDDY, 1976; HAMMERSHMIDT et al.1982; BAZZALO et al.1985).

### 2.9.1- Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé pour l'analyse des enzymes et des polyphénols est reparti comme suit:

-Deux lots de la variété 76TA124, dont l'un des lots étant constitué de plants témoins non inoculés et l'autre constitué de plants inoculés avec l'isolat F5.

-Deux lots de la variété Métropole, dont l'un étant constitué de plants témoins et l'autre constitue des plants inoculés par l'isolat F5.

### **2.9.2- Préparation de l'extrait enzymatique:**

La préparation de l'extrait enzymatique, a été réalisé selon la technique de MAXWELLE et BATMAN (1968). Pour l'extraction enzymatique, les organes (racines et tiges) sont lavés plusieurs fois, puis séchés entre deux papiers filtres. Le tout est mélangé et écrasés dans un mortier avec une solution tampon de phosphate de sodium (0.1M, pH 7.1).

Le contenu est filtré à travers un papier filtre en double épaisseur. Le filtrat est ensuite recueilli dans un erlenmeyer de 50 ml puis centrifugé à 3000 tr/mn à une température de 6°C. Le surnageant recueilli sera utilisé directement pour l'évaluation de l'activité enzymatique.

### **2.9.3- Dosage des oxydases par spectrophotométrie :**

Les extraits enzymatiques sont dosés selon le principe décrit par GERMAIN et LINEN (1981). Nous avons utilisé le spectrophotomètre d'absorption type SHIMADZU UV-150, qui nous donne l'absorbance en fonction du temps. Pour l'étalonnage de l'appareil, nous avons utilisé de l'eau distillé.

### **2.9.4- Méthode de dosage des oxydases :**

#### **2.9.4.1- Dosage de peroxydase :**

L'activité peroxydasique est testée par la méthode de MAXWELLE et BATMANN (1967). Les réactifs utilisés sont présentés en annexe 6b. L'ensemble est porté à une température de 28°C. Au début de la réaction, l'absorbance du mélange est prise à une longueur d'onde de 495nm, alors que l'évolution de l'absorbance est enregistré toutes les 30 secondes pendant 5mn.

#### **2.9.4.2-Dosage des polyphénoloxydases :**

La technique utilisée est celle proposée par MAXWELL et BATMAN (1967). Le mélange réactionnel est décrit en annexe 6b.

L'évolution de la densité optique est prise à une longueur d'onde de 495 nm toutes les 30 secondes pendant 5mn.

### **2.9.4.3-Dosage de la catalase:**

L'activité de cette enzyme est testée selon la méthode de BEERS et al (1952) modifiée par MAXWELLE et BATMANN (1967). Les différents réactifs nécessaires pour le dosage de la catalase, sont présentés en annexe 6b et le mélange réactionnel est porté à une température de 33°C.

L'évolution de la densité optique est prise à une longueur d'onde de 240 nm toutes les 30 secondes pendant 5mn.

### **2.9.4.5- Dosage de l'acide ascorbique oxydase:**

L'activité de cette enzyme est testée selon la méthode de OBERBACHER et VINES (1963). Les constituants du mélange réactionnel donnés en annexe 6b, sont mélangés et portés à une température de 33°C. La lecture de la densité optique se fait à une longueur d'onde de 256 nm toutes les 15 secondes pendant 3mn.

## **2.9.5- Méthode de dosage des polyphénols:**

### **2.9.5.1-Principe de la méthode:**

Les polyphénols sont dosés selon la méthode colorimétrique de FOLLIN DENIS(1963), décrite par JOSLYN (1979).

Le principe de la méthode est basé sur la réduction de l'acide phosphomolybdique et tungstique en milieu alcalin et en présence des tannins. le mélange réactionnel donne une coloration bleue, dont l'intensité est mesurée à une longueur d'onde de 760nm.

### **2.9.5.2- Extraction des polyphénols :**

L'extraction des polyphénols se fait à l'aide de solvant constitué d'un mélange d'acétone et de l'eau distillée (40v-60v).

Dans 250 ml de ce solvant, sont additionnées 5 g de poudre végétale finement broyé. Après une heure, le mélange est récupérée à 400 tr/mn. Le surnageant, est récupéré et concentré au rotavapor.

### 2.9.5.3- Dosage colorimétrique:

A 750 ml d'eau distillée dans une fiole de 1000 ml. sont ajoutés successivement:

- 1 ml d'échantillon de la solution à étalonner;

- 5 ml de réactif de FOLLIN DENIS (composition en annexe 6b);

- 10 ml de solution saturée de carbonates de sodium;

La lecture de la densité optique se fait après 30 mn, à une longueur d'onde de 760 nm.

### 3- RESULTATS ET DISCUSSION :

#### 3.1- ANALYSE DE LA MYCOFLORE TOTALE:

##### 3.1.1- Fréquence des principaux champignons véhiculés par semences:

En testant l'efficacité des différentes techniques de mise en évidence de champignons véhiculés par semences, la technique d'Agar test s'est montrée la plus efficace pour l'étude de la mycoflore associée aux semences (tableau 10).

La désinfection des semences ne s'est pas montrée suffisante pour éliminer certains agents saprophytes tels que: *Aspergillus spp*, *Cladosporium spp*; *Penicillium spp* et les *Stemphylium spp*

Quant à *Alternaria sp*, celui ci s'est retrouvé pratiquement dans toutes les catégories de semences avec des fréquences qui diffèrent d'une variété à une autre allant de 1 à 5 %.

Des espèces saprophytes ont été aussi observées aussi bien par la méthode d'Agar test ou celle du Blotter test. Nous avons noté par ailleurs, des taux relativement élevés de *Penicillium sp* et *Aspergillus spp* par la méthode de Blotter test ( tableau 10).

Tableau 10: Résultats de comparaisons de deux méthodes d'analyse de la mycoflore associée aux semences de lentille de la variété Syrie 229 en % de semences infectées:

Champignons isolés	Méthode d'analyse	
	Agar test	Blotter test
<i>Alternaria sp</i>	4%	0%
<i>Ascochyta sp</i>	1%	0%
<i>Aspergillus spp</i>	4%	6%
<i>Fusarium spp</i>	9.5%	1%
<i>Penicillium sp</i>	4%	5%
<i>Stemphylium sp</i>	0%	0%

### 3.1.2-Taux d'infection des semences par le genre *Fusarium*:

la méthode d'Agar test s'est montrée la plus efficace pour la mise en évidence du genre *Fusarium* en comparaison avec la méthode de blotter test (tableau 10). ceci peut s'expliquer principalement par les caractéristiques de chaque test.

L'étude microscopique des espèces de *Fusarium* isolées lors de ce test, a permis de révéler la prédominance de deux espèces de *Fusarium* à savoir: *F. solani* et *F. oxysporum*. Une autre espèce a été aussi rencontrée, caractérisée notamment par une absence totale de microconidies et une abondance de macroconidies, cependant sa fréquence demeurent très faible ne dépassant guère les 1%.

D'autre part, l'apparition des certains champignons semblent exercer un effet inhibiteur sur certains agents pathogènes. C'est le cas dans notre essai où on a constaté le blocage de croissance du *Fusarium* soit par des *Alternaria sp* ou des *Aspergillus spp.*

Le tableau 11, et la planche 2 montrent que les semences locales sont apparues plus vulnérables aux divers agents, et particulièrement au genre *Fusarium*. Ainsi, les deux variétés Syrie 229 et Balkan très cultivées dans les différents régions prospectées semblent être les plus infectées par le genre *Fusarium* et particulièrement le *Fusarium solani* et *F.oxysporum* en comparaison avec les variétés introduites. A ce titre, la variété Syrie a montré le degré d'infection le plus élevé avec une fréquence de 10.5%, suivi par la variété Balkan et la Métropole avec des taux de 5 %, et 4.5% respectivement.

Pour les variétés introduites, la variété F88, a montré le taux d'infection par le genre *Fusarium* le plus élevé et qui est de 7%, alors qu'il ne dépasserait guère les 2.5% pour les autres variétés.

**Tableau 11: Fréquence (% de graines infectées) des champignons associés aux semences de lentille par la méthode d'Agar test**

Champignon Variétés	<i>Fusarium</i> spp	<i>Ascochyta</i> spp	<i>Penicillium</i> sp	<i>Alternaria</i> sp	<i>Aspergillus</i> spp	<i>Stemphyllium</i> sp
NEI 468	2	0	5	0	6	0
EVL	0	1	2	3	5	0
EDLIS	0	0	4	1	1	0
SYRIE	10	1	4	5	5	1
BALKAN	5	0	0	2	0	0
76TA124	4	1	5	0	5	0
F89-10L	4	0	2	5	0	0
F84-16L	7	1	0	2	4	2
F86-16L	4	2	1	3	0	1
ILL 4400	2	1	2	0	3	1
Métropole	3	0	4	3	2	0

### 3.1.3-Discussion et conclusion:

Dans nos essais, d'analyse des semences, la méthode d'Agar test s'est montrée la plus efficace quant à l'extériorisation des agents pathogènes et particulièrement le genre *Fusarium*.

En effet, l'Agar test est constitué par un milieu nutritif riche en matières organiques (notamment le glucose) et les éléments minéraux par rapport au blotter test qui, consiste à l'utilisation d'un papier buvard stérilisé caractérisé simplement par la richesse en cellulose. L'autre différence réside dans le degré d'humidité qui caractérise l'environnement de chaque milieu.

Dans l'Agar test, le milieu est exposé généralement à une humidité constante qui est celle du milieu gélosé, alors que dans le Blotter test, le papier buvard est sujet à de nombreuses variations d'humidité au cours de l'essai.

Les analyses réalisés sur les différentes variétés de semences, ont montré la présence de différents agents pathogènes et saprophytes avec des degrés variables.

Concernant les *Fusarium spp*, nous avons pu identifier la présence de deux espèces redoutables pour la culture de la lentille à savoir, *F. solani* et *F. oxysporum*.

En étudiant la mycoflore associée aux semences, ERSKINE et al (1990), ont montré l'importance de l'infection des semences de certains cultivars de lentille par le genre *Fusarium* et notamment le *F. oxysporum* et le *F. solani*. Ces mêmes observations ont été faites par d'autres auteurs (WUSTERKUND et al, 1973; KHARE, 1980; BAYA'A et ERSKINE, 1990).

Les analyses faites dans d'autres pays, montrent la présence d'autres champignons que nous n'avons pas pu détecter sur nos semences au cours de ce test. C'est le cas principalement de *Rhizoctonia bataticola* et *Ascochyta lentis* (HAWARE et al, 1986; KAISER et HANNAN, 1986), qui réduisent considérablement le pourcentage de germination.

En Inde, RAJENDRA et CHANDHARY (1987), notent également que sur les 41 agents transmis par certains cultivars de lentille, seules les espèces *F.oxysporum*, le *F. solani* et l'*Alternaria alternata* prédominent. Ces mêmes remarques ont été faites auparavant par VISHUNUVAT et SHLUKLA en ( 1979) et SHARMA et al (1987).

Par ailleurs, on a pu noter dans certains cas l'absence de germination pour les grains attaqués par le genre *Fusarium*, et présentent parfois des symptômes de pourritures.

En effet, ces observations ont été déjà notées avec le *F. oxysporum* par KUMAR et HAWARE (1983) ainsi que BAYA'A et ERSKINE (1990), où ils notent que la présence du *F. oxysporum* même avec une faible fréquence, peut provoquer une réduction du taux de germination qui peut aller jusqu'à 54%. Ces mêmes observations ont été faites pour les semences de pois où il a été constaté que les graines attaquées par le *F. solani f.sp. pisi* présentent des pourritures (SHUKLA et BHARGAVA, 1977 in SHETTY, 1988) ainsi que des réductions dans la germination (SAAD et al, 1988 in SHETTY, 1988).

par ailleurs, selon d'autres auteurs, plusieurs champignons sont associés aux semences de lentille, qui peuvent entraîner un retard dans la germination et parfois provoquent la pourriture des graines et des plantules ou des maladies à des stades tardifs et par conséquent une perte de rendement (VISHUNAVAT et SHUKLA, 1979; ABDELHAFEZ, 1984; PRASAD et BASUCHAUDHARY, 1987, SEID et BENIWAL, 1988; ERSKINE et al, 1990).

Quant à la présence de l'*Alternaria* sp, il n'a pas été encore vérifié s'il s'agit d'un agent saprophyte ou d'un agent pathogène interne. En effet, plusieurs espèces d'*Alternaria* sont mentionnés dans la bibliographie, et qui peuvent parfois être des agents très redoutables pour la culture de lentille. C'est le cas surtout de l'*Alternaria alternata* (SHARMA et al, 1978; RAJENDRA et al, 1987).

Concernant la présence des agents saprophytes, bien qu'ils soient faibles en fréquence d'apparition avec la méthode d'Agar test, celles ci ont montré un pouvoir compétitif caractérisé par une croissance rapide par rapport aux autres agents, notamment pour l'*Aspergillus* vis à vis de *Fusarium* sp. de même pour l'*Alternaria* vis à vis au *Fusarium*.

En effet, une étude comparable sur la mycoflore associée aux semences de pois chiche, KUMAR et al (1983), notent que la présence de certains saprophytes sur semences empêchent par compétition l'apparition des principaux champignons.

Quant à l'apparition de quelques agents saprophytes avec le Blotter test avec parfois des fréquences élevées (6%) sur la variété Syrie 229 (tableau 10), ceci peut s'expliquer par le fait que les agents en question sont des champignons qui ont une faible exigence nutritionnelle, et un faible degré d'humidité tel *Aspergillus spp.*

### 3.2- IMPORTANCE AU CHAMP DES AGENTS DE POURRITURE RACINAIRE ET DE TRACHEOMYCOSE DE LA LENTILLE:

#### 3.2.1- Résultats:

Dans la majorité des parcelles visitées, l'espèce *F.solani* a été isolée à partir des racines présentant, soit des pourritures soit des nécroses.

Quant au *F. oxysporum*, il a été principalement isolé à partir des échantillons ramenés de la parcelle de la région de Dahmouni. Dans ce cas, le *F. oxysporum* a été isolé aussi bien des racines, que de la tige (tableau 12). Les fréquences des deux espèces de *Fusarium* (*F. oxysporum* et *F. solani*), responsables du flétrissement et de la pourriture racinaire ou d'un complexe de symptôme, sont présentées dans le tableau 12.

Il est à noter que le pourcentage total d'abondance, a été calculé par la méthode de MARCIA et al (1983) in ROUIBAH (1989), en utilisant le rapport suivant:

$$\text{Abondance (\%)} = \frac{\text{Nombre d'isolats de l'espèce donnée} \times 100}{\text{Nombre total d'isolat}}$$

La recherche sur l'origine du flétrissement et de la pourriture racinaire, nous a permis d'impliquer le *F. solani* comme étant le principal agent de la pourriture racinaire et du jaunissement, et parfois le flétrissement de la partie aérienne.

Nous notons par ailleurs, que durant la campagne agricole 1991-1992, et 1992-1993, le *F. solani* a été isolé avec des fréquences très élevées, allant de 60% dans la zone de Ammouri à 90% dans la zone de Sabiine et Tasslamt.

Cependant, l'association de *F. oxysporum* et du *F. solani* ne s'est trouvée qu'en faible proportion au niveau du système racinaire, ne dépassant que rarement les 10%.

Par contre le *F. oxysporum* a été rencontré seul dans la région de Dahmouni (W:Tiaret) durant la campagne agricole 1992-1993. Les plantes dans ce cas présentaient des symptômes de flétrissement et parfois un jaunissement.

accompagné d'un flétrissement et d'un brunissement vasculaire. Dans ce cas, l'agent pathogène a été isolé avec des fréquences atteignant les 90%.

L'association du *F. solani* et du *F.o.l.* n'a été rencontrée que dans deux zones à savoir Ammouri et Tasslamt avec des fréquences de 10% et 5 % respectivement.

**Tableau 12: Fréquence d'isolement du *Fusarium solani* et du *F. o. l.* associés à la lentille, dans les régions de Tiaret et de Tissemsilt.**

Région	Zones	Code de la parcelle	Nature des symptômes	FO (%)	FS (%)	FS+FO (%)
TISSEMSIT		TA1	Flétrissement, jaunissement et pourriture racinaire	10	60	10
	Ammouri	TA2	Jaunissement et pourriture racinaire	00	85	00
		TT1	Jaunissement et pourriture racinaire	00	85	00
	Tasslamt	TT2	Jaunissement et pourriture racinaire	5	90	05
TIARET	Sabiine	TS1	Jaunissement, flétrissement et pourriture racinaire	00	90	03
	Dahmouni	TD1	Flétrissement, jaunissement et décoloration vasculaire	90	00	00

**FO:** *Fusarium oxysporum*

**FS:** *Fusarium solani*

**FO+ FS:** Association de *Fusarium oxysporum* + *F solani*

### 3.2.2 - Discussion et conclusion:

Il ressort du tableau 12 ci dessus cité, qu'au cours de nos isolements, le *Fusarium* fût le genre le plus fréquemment isolé, avec des pourcentages d'abondance atteignant les 90%.

Cependant, d'autres champignons ont été aussi isolés et identifiés en particulier *Alternaria spp.*, *Penicillium sp.*, *Stemphylium spp* avec des pourcentages respectives de 10%, 5% et 4.5%.

Nous avons noté lors des identifications que le *Fusarium oxysporum* est caractérisé par des macroconides pluricellulaires: (3-6 cellules); à parois minces avec une cellule de basale et une cellule apicale. Les microconidies sont unicellulaires et rarement bicellulaires, ces conidies sont portées sur des conidiophores courts et simples.

Les chlamydospores se forment individuellement dans des macroconidies terminales, ou intercalaires dans les hyphes. Ces observations corroborent avec celles décrites par SMITHSON et al (1985); GUPTA et al (1986) et BENIWAJ, et al (1993).

En revanche, les isolats de *F. solani*, espèce voisine de la précédente, sont caractérisés par la présence de conidiophores longs et ramifiés portant des micro et des macroconidies. Les premiers sont réniformes uni et bicellulaires. Les macroconidies ont des extrémités plus arrondies que celles du *F. oxysporum*. Les cloisons sont fréquemment en nombre de trois, mais ce nombre peut varier de 2 à 4. Les chlamydospores simples ou doubles, terminales ou intercalaires, ont une forme ovale à sphérique et à paroi lisse. Ces observations semblent être en concordance avec celles de TRAPERO-CASAS (1983) et ALAVARAZ et BRINER (1987).

Les isolements effectués à partir des plants présentant des symptômes de flétrissement, jaunissement et des attaques racinaires, ont mis en évidence dans la majorité des cas, la présence d'agents de pourriture racinaire tels décrits sur pois chiche par TRAPERO-CASAS et JIMENEZ -DIAZ (1985, a, b) et MORENO (1984) et SIHASSEN (1990). Sur lentille, ce complexe a été décrit par ERSKINE et al (1990).

Les investigations entreprises durant les campagnes 91-92 et 92-93, nous ont permis de confirmer la présence de deux principales espèces fusariennes: *F. solani* et *F. oxysporum* responsables respectivement de la pourriture racinaire et de la trachéomyose. L'absence d'une de ces deux espèces en association ne peut s'expliquer par un éventuel antagonisme entre ces deux espèces.

A ce titre, KRAFT(1969), rapporte que le premier site d'infection du *F. solani* est le lieu d'attachement des cotylédons alors que le site d'infection du *F. oxysporum* se fait par les poils absorbants. Donc nous pouvons dire comme il a été déjà noté par KRAFT (1978); NYVALL et HAGLUND(1972), qu'il n'y a pas d'antagonisme entre le *F. oxysporum* et le *F. solani*, ce dernier s'attaque au cortex racinaire.

Dans ce cas, il reste à considérer les facteurs externes, tels que l'itinéraire techniques (date de semis, emploi de certains pesticides,...), Ou les facteurs physiques, notamment la température et l'humidité du sol. Dans ce même contexte, KRAFT et ROBERTS (1969), signalent qu'une forte humidité et un mauvais drainage du sol, sont des facteurs qui favorisent l'installation beaucoup plus des agents de pourriture racinaire au profit, des agents de flétrissement.

Quant aux autres espèces isolées, à savoir *Penicillium sp* et *Stemphylium sp*, aucune référence bibliographique ne fait mention de ces agents, sauf qu'elles sont considérées par plusieurs auteurs comme une flore d'accampagement. Cependant,

les espèces d'*Alternaria* et notamment l'*A. alternata* est citée parfois comme agent du complexe de la pourriture racinaire du flétrissement. Mais dans ce cas, il se retrouve généralement avec des taux dépassant les 15 %, ce qui n'est pas le cas dans nos isollements, où les *Alternaria spp* ont été retrouvés qu'avec des taux faibles ne dépassant guère les 3%. C'est la raison pour laquelle nos travaux ultérieurs seront orientés principalement aux agents de pourriture et de la tracheomycoses.

En effet, WUSTERLUND et al (1974), rapportent qu'en Californie, les symptômes de flétrissement et de pourriture racinaire du pois chiche sont dus à l'association de quatre champignons: il s'agit du *F. oxysporum f.sp.ciceris* en premier lieu, vient ensuite le *F. solani*, le *Rhizoctonia solani* et *R. bataticola*. Les deux premiers agents sont responsables de jaunissement et un flétrissement de la partie aérienne, mais avec un brunissement vasculaire pour le *F. oxysporum*.

Alors qu'en Inde, en présence de tels symptômes sur pois chiche, seul le *F. solani* a été détecté avec une fréquence plus élevée que *F. oxysporum* et *R. solani* (GRAWAL et al, 1974). D'ailleurs BODJDOVA et al (1990), travaillant plus récemment sur les agents responsables du flétrissement et de la pourriture racinaire de la lentille, ont montré que cette pathologie est liée principalement au *F.o.l.* d'une part et au *F.solani* et *F. culmorum* d'autre part.

En étudiant la manifestation du *F.o.c* et du *F. solani*, GUPTA et al (1986), VAN RHEEMEN et al (1989), ont pu montrer que celle-ci est déterminée principalement par l'influence de la température où l'optimum est respectivement pour les deux agents de 25°C et 20°C.

Dans le même ordre d'idée, YA SHENG (1981), travaillant sur la pathologie de la lentille au Canada, a remarqué que l'infection de la lentille par le *F.o.l.* ou le *F.solani* est beaucoup plus déterminée par la température.

En Espagne, ces symptômes sont dus principalement à l'association de trois agents, à savoir: *F. oxysporum*, *F. solani* et *R. bataticola*, avec des fréquences de 93%, 53% et 13% respectivement (TRAPERO-CASAS et JIMENEZ-DIAZ, 1985, a, b).

Par ailleurs, en Syrie, ce complexe maladif cause des dégâts très importants détruisant parfois plus de 13% de la production de la lentille. Quant aux principaux agents qui y sont responsables, on trouve le *F.o.l.* avec 60%, le *F. solani* avec 37.5% et enfin le *Sclerotinia sclerotiorum* avec 2.5% (ERSKINE et al, 1990).

### 3.3-PATHOGENIE COMPAREE DE QUELQUES ISOLATS DE *F.SOLANI* ET *F.OXYSPORUM*

#### 3.3.1- Résultats:

A la fin de l'expérimentation qui correspond à 45 jours après semis, nous avons noté la présence de mortalité de certains plants, dont la plupart des plants inoculés présentaient les symptômes caractéristiques de la maladie.

L'évaluation de la pathogénie s'effectue par le calcul du degré d'attaque. Aussi, nous avons mesuré le pourcentage de réisolement de l'agent pathogène 45 jours après inoculation.(tableau 13).

Parmi les isolats testés, neuf sont pathogènes sur la culture de la lentille (variété Syrie229) avec différents degrés d'attaque. Sur les huit isolats obtenus lors de nos prospections sur terrain, quatre ont entraîné des symptômes liés à la présence du *Fusarium solani*. Par contre, un isolat a entraîné des symptômes d'un agent de *Fusarium oxysporum*.

Les types de syndromes occasionnés par les différents isolats testés peuvent se répartir en:

- a- Jaunissement avec pourriture noire des racines, cas des isolats F1 et F4;
- b- Complexe jaunissement- flétrissement avec pourriture noire des racines, cas des isolats F5, F3 et FT;
- c- Complexe jaunissement- flétrissement avec décoloration vasculaire, cas des isolats FD.

Les isolats obtenus à partir de semence, se sont montrés en général pathogène sur la variété de lentille testée. Les isolats FSY et F89 isolés respectivement de semence de lentille variété Syrie et F89-16L ont entraîné des symptômes liés au *Fusarium solani*, alors que l'isolat FIL16 isolé à partir des semences de lentille (variété: ILL16), a présenté quant à lui, des symptômes liés au *F.o.l.*

Les isolats F2 et F6 isolés respectivement des racines et de la tige, ce sont montrés totalement inoffensifs à la culture de lentille à part quelques chutes de feuilles observées lors des premiers jours d'inoculation.

Quant au taux de réisolement de l'agent pathogène, celui ci a été obtenu à partir de tous les plants inoculés. Cependant, ce taux de réisolement, reste faible chez les plants qui n'ont présenté que de très faibles symptômes ou pas de symptômes (%DA<

5%), alors qu'il dépasse les 25% pour les isolats qui ont entraîné des symptômes visibles.

**Tableau 13: Pathogénie comparée de quelques isolats de *Fusarium solani* et *F. oxysporum* sur la lentille (variété: Syrie229).**

Isolats	Degré d'attaque	Taux de Réisolement	Organe de réisolement	Types de symptômes (45 jours après)
F1	58%	28%	Racine	Jaunissement +pourriture noire des racines
F2	10%	04%	Racine	Sain
F3	56%	26.5%	Racine	Jaunissement +pourriture noire des racines
F4	32.5%	20%	Racine	Jaunissement +pourriture noire des racines
F5	70%	29%	Racine	Flétrissement, jaunissement + pourriture racinaire
F6	05%	3%	Tige	Sain
FT	50.9%	25%	Racine	Jaunissement +flétrissement +pourriture noire racinaire
F89	39%	18%	Semence (variété F8919L)	Jaunissement +pourriture noire des racines
FSY	37.5%	18%	Semence (variété Syrie )	Jaunissement +taches nécrotiques sur collet
FIL16	25%	15%	Semence (variété: II.L.16)	Flétrissement, jaunissement et décoloration vasculaire
FD	46%	48%	Racine -tige	-Flétrissement, jaunissement et décoloration vasculaire

### 3.3.2- Discussion et conclusion:

L'analyse de la variance du degré d'attaque(annexe 19) nous a permis de dégager des différences significatives entre les isolats testés. Le test de Newman-Keuls a permis de distinguer les groupes homogènes suivants:

Premier groupe: comprend l'isolat F5.

Deuxième groupe: comprend l'isolat FT, F1, F3.

Troisième groupe: comprend l'isolat F89, FSY et F4.

Quatrième groupe: comprend l'isolat F2 et F6.

Dans nos essais, les symptômes commencent généralement, à apparaître dès le 20<sup>ème</sup> jours d'inoculation avec un début de jaunissement de l'extrémité des folioles des feuilles basales accompagné parfois d'un flétrissement de ces feuilles. Ces

symptômes s'étendent par la suite vers les parties apicales, et ceci d'une façon progressive.

Concernant la précocité des symptômes, nous n'avons pas pu détecter la relation entre la précocité dans l'apparition des symptômes et le degré d'agressivité à la fin de l'expérimentation. Ainsi par exemple, chez l'isolat *F. solani* (F3), où les symptômes occasionnés sur la lentille commencent déjà au 18<sup>ème</sup> jour, le degré d'attaque au 25<sup>ème</sup> jours était déjà à 30%, alors que ce degré d'attaque n'a évolué que faiblement après. En fin d'expérimentation, cet indice n'a été que de 56%, alors chez l'isolat F5, les symptômes n'ont apparu qu'après le 25<sup>ème</sup> jours; le degré d'agressivité en fin d'expérimentation était de 70%.

Pour ce qui est de la reproductibilité des symptômes, nous avons remarqué qu'en général les symptômes obtenus par inoculation de la maladie sont de loin proche de celle observés in situ en plein champs.

Plusieurs auteurs considèrent que la sévérité de la maladie et la reproductibilité des symptômes sont liés essentiellement aux stades phénologiques de la plante, d'une part, et à la méthode d'inoculation d'autre part (ALAVAREZ et MORENO, 1984).

En effet, dans nos essais, nous avons essayé d'obtenir une infection aussi proche de celle produite naturellement. Le sol étant la source habituelle de l'inoculum, nous avons opté pour cela à une méthode d'inoculation du sol, bien qu'il existe d'autres méthodes d'inoculation, dont la plus utilisée est la méthode d'inoculation par trempage des racines dans une suspension de spores. En effet, cette dernière méthode est caractérisée par deux principaux avantages: un besoin faible en moyen matériel et en temps ceci d'une part et une rapidité dans l'extériorisation de symptômes d'autre part. Cependant, on lui est reproché, une utilisation d'une concentration élevée en inoculum et également des dégâts provoqués sur le système racinaire suite au dépotage et à l'empotage des plantules lors de leur inoculation. Il en résulte ainsi une amplification de la sévérité de la maladie au niveau des plantes hôtes inoculés.

En effet, les symptômes causés par le *F. solani* sont déjà décrits par plusieurs auteurs sur un certain nombre d'espèces (Pois chiche, lentille, pois,...) (ALAVAREZ et MORENO, 1984; WUSTERLUND et al, 1974; TRAPERO-CASAS et JIMENENZ-DIAZ, 1985 a, b), à savoir:

-Jaunissement foliaires et parfois un flétrissement accompagné d'un dessèchement des feuilles basales;

- Coloration noire du collet et des racines;
- Décoloration vasculaire du système racinaire;
- Réduction de la croissance des plantes.

Quant aux symptômes causés par le *F.o.l.*, il s'agit d'un flétrissement accompagné d'un jaunissement avec une décoloration vasculaire au niveau de la tige (ALAVAREZ et MORENO, 1984; WUSTERLUND et al, 1974).

Les isolats FSY, FD et FIL16 ayant causé des symptômes de flétrissement sur lentille appartiennent en fait à une seule forme spéciale: *Fusarium oxysporum f.sp. lentis*.

En effet, HAWARE et NENE (1982), ont montré que le *F.o.l.* est pathogène seulement sur la culture de la lentille et qu'il peut parasiter des racines de plusieurs espèces de plantes cultivées et de mauvaises herbes (pois chiche, haricot, melon, luzerne,...) sans causer de symptômes visibles.

Concernant le réisolement de l'agent pathogène à partir de plants inoculés, ceci a été fait pratiquement à partir de toutes les plantules avec cependant des degrés d'attaques différents. Même les plantes qui n'ont pas présentés des symptômes, semblent pouvoir héberger l'agent pathogène. Néanmoins, aucune corrélation n'a pu être faite entre le degré d'attaque et le taux de réisolement de l'agent pathogène.

### **3.4-CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DES DEUX PRINCIPAUX AGENTS PATHOGENES RESPONSABLES DE POURRITURE RACINAIRE ET DE TRACHEOMYCOSE:**

#### **3.4.1- Variation morphologique et culturale:**

L'étude morphologique des différentes espèces et isolats obtenus a porté sur la mensuration des conidies (macro et microconidies ) ainsi que l'aspect cultural de la croissance des colonies en milieu artificiel (couleur, texture et présence ou absence de chlamydo-spores).

### 3.4.1.1- Aspect cultural de la croissance des colonies:

Contrairement à beaucoup d'autres champignons pour lesquels l'aspect cultural de la colonie n'est pas pris en considération, l'expérience a montré qu'il n'en est pas de même pour les *Fusarium spp.* C'est ce qui nous a amené au cours de nos isolements pratiqués de différents organes, à retenir ce critère dans une première approche à l'identification des isolats.

Notons que l'aspect général d'une colonie, est déterminé par la couleur de la colonie, sa texture et enfin la présence de chlamydozoospores.

L'examen du tableau 14, montre une variation de l'aspect général entre les isolats de *F. solani*. La coloration varie du couleur brique (F1 et FT) au violet foncé (F5).

Quant à l'isolat du *F.o.l.* (FD), celui ci a présenté une coloration caractéristique d'un *F. oxysporum*, c'est à dire une couleur lie de vin.

S'agissant de la présence de chlamydozoospores, elle est notée chez tous les isolats, à des degrés de fréquence variable. Ainsi, nous avons pu remarqué une surabondance chez l'isolat FT, et une faible présence chez l'isolat F5.

Concernant la texture de la colonie, nous avons relevé deux types de mycélium: aérien, chez l'isolat F1 et rasant chez les isolats F3, FT et F5 (tableau 14 et pl. 4).

Quant à l'isolat FD, il présente sur milieu PDA, un mycélium rasant avec des mèches au centre de la colonie (mycélium hérissant).

Nous avons noté également la présence de zonations concentriques chez les deux isolats de *F. solani*: F3 et FT (tableau 14).

**Tableau 14: Aspect cultural des colonies de différents isolats sur milieu PDA en lumière alternée.**

Isolats	Caractères culturaux	Pigmentation de la colonie	Texture de la colonie	Présence de chlamydozoospores
F1		Couleur rouge brique	-Mycélium aérien et cotonneux -Mycélium abondant -Absence de zonations	++
F3		Couleur rouge brique foncé	-Mycélium souvent rasant Présence de zonations	++
F5		Violet foncé	Mycélium ras Absence de zonations	+
FT		Couleur rouge brique	-Mycélium souvent rasant -Présence de zonations	+++
FD		Couleur lie de vin diffuse	Mycélium rasant avec mèches au centre de la boîte	++

#### 3.4.1.2- Dimension et types de conidies:

Les tableaux 15 et 16 donnent pour chaque isolat étudié, les limites supérieures et inférieures de la taille des micro et macroconidies.

Chez les isolats de *F. solani*, les macroconidies sont assez allongés et peu incurvés, la moyenne de leur longueur est de 32.8  $\mu\text{m}$ , avec un intervalle allant de 30.5 $\mu\text{m}$  à 35 $\mu\text{m}$  chez l'isolat F3, et une moyenne de 33.2 chez l'isolat F5 avec un intervalle allant de 33.1 à 36.2 $\mu\text{m}$ . Les cloisons sont au nombre de 3 à 4, mais les macroconidies ayant trois cloisons sont très importantes chez les quatre isolats de *F. solani*.

L'analyse statistique nous a montré qu'il n'y a pas de différences significatives pour la longueur entre les isolats de *F. solani*. La seule différence, est celle qui existe entre le *F. solani* et le *F.o.l.* (annexe 18).

Quant au diamètre des macroconidies, il semble varier très peu d'un isolat à un autre, en général de 2.8  $\mu\text{m}$  chez l'isolat F1, F5 à 3.2 $\mu\text{m}$  chez l'isolat F3. L'analyse statistique montre des différences significatives entre les isolats pour ce facteur (annexe 16). Le test de Newman-Keuls, nous a permis de distinguer trois groupes d'isolats homogènes:

Premier groupe: constitué par l'isolat F5, F1 et F3.

Deuxième groupe: constitué par l'isolat FT.

Troisième groupe: constitué par l'isolat FD.

L'isolat FD, quant à lui, présente des macroconidies peu allongées, et la longueur varie de 13  $\mu\text{m}$  à 18 $\mu\text{m}$  avec une moyenne de 15 $\mu\text{m}$ (Tableau 15). Quant au diamètre, il varie de 2 à 4 $\mu\text{m}$  avec une moyenne de 2.8  $\mu\text{m}$  et des incurvations marquées.

La forme générale des microconidies chez les isolats de *F. solani* est de type ovoïde, mais rarement ellipsoïde; alors que les microconidies sont généralement unicellulaires et parfois bicellulaires.

Chez l'isolat FD, par contre, les microconidies sont généralement de forme ellipsoïdale, et sont majoritairement unicellulaires. Leur taille varie de 4.1  $\mu\text{m}$  à 4.7 $\mu\text{m}$  et de 1.2 $\mu\text{m}$  à 2.3  $\mu\text{m}$ . Chez les isolats de *F. solani*, la longueur des microconidies, varie d'un isolat à un autre, avec une moyenne allant de 5.2 chez l'isolat F1 à 5.7  $\mu\text{m}$  chez l'isolat FT. Quant au diamètre, celui ci varie de 2.5 $\mu\text{m}$  pour l'isolat F3 à 2.8  $\mu\text{m}$  pour les isolats FT et F5.

L'analyse statistique portant sur la longueur des microconidies (annexe 19), nous a montré qu'il y' a des différences significatives entre les quatre isolats de *F. solani*, mais aussi entre celles ci et l'isolat de *F.o.l.* (annexe 19).

Ainsi le test de Newman -Keuls, nous a permis de regrouper les isolats en quatre groupes homogènes:

Premier groupe: constitué par l'isolat F5.

Deuxième groupe: constitué par l'isolat F3 et FT.

Troisième groupe: constitué par l'isolat F1.

Quatrième groupe: constitué par l'isolat FD.

## PLANCHE 4

Figure 1: Aspect cultural de quelques isolats de *Fusarium solani* utilisés dans les différents tests

F1	F3	F6
F2	FSY	F4
F88	F5	FT

En effet, en étudiant le genre *Fusarium*, BOOTH (1971), a trouvé que les dimensions des conidies, ainsi que le rapport (longueur/ diamètre) varient considérablement d'une espèce à une autre. Ainsi par exemple, il a trouvé que pour le *F. oxysporum*, les dimensions des microconidies sont de (4µm-5µm x 1µm-2.5µm), alors qu'elles sont de 5µm-6µm x 2µm-3.5µm) chez le *F. solani*.

Pour les macroconides, ces différences sont très nettes en comparaison aux microconidies. Le même auteur a noté que les dimensions de ces conidies sont de (13µm-22µm x 2µm-3µm) chez le *F. oxysporum* alors que chez le *F. solani*, elles sont de (32µm-37µm x 2µm-3µm).

Dans notre étude, des différences inter spécifiques ont été relevées mais elles ne nous ont pas permis d'expliquer les différences dans pathogénicité entre les isolats. Par conséquent on ne peut pas expliquer le lien avec la nature de l'agressivité, ainsi que la pathogénicité de ces isolats. Par contre, ce critère a été utilisé avec un certain succès pour expliquer la pathogénicité de certains isolats et formes spéciales chez *Erysiphe polygoni* (STANLY et HANSON, 1966).

Quant au critère aspect cultural défini par la texture et la couleur, nous avons pu relevé des différences entre les isolats. Concernant la couleur des colonies de *F. solani*, celle-ci varie de la couleur rouge brique au violet foncé, en passant par la couleur violette. Alors que celle de l'isolat du *F.o.l.* (FD), elle est caractéristique de l'espèce celle déjà décrite par BOOTH (1971), il s'agit en l'occurrence d'une couleur lie de vin diffuse.

S'agissant de la texture des colonies de *F. solani*, celle-ci semble très variable, allant du mycélium aérien au mycélium rasant avec présence parfois de zonations concentriques. L'isolat de *F.o.l.* a présenté une texture proche de celle du *F. solani*, il s'agit d'un mycélium rasant avec la présence de mèches au centre de la colonie ainsi que la présence de zonations concentriques. Ces similitudes rencontrés au niveau de la texture entre le *F. solani* et le *F.o.l.* ont été notées par plusieurs auteurs ((BOOTH, 1971, MEESSIAEN et CASSINI, 1968; NELSON et al, 1983; TOUSSON et NELSON, 1976).

Donc nous pouvons dire, que ni la couleur ni la texture de colonie ne peuvent expliquer à elles seules les différences fondamentales entre les isolats de *F. solani*, à savoir le degré d'agressivité de ces isolats.

Le seul point important relevé au cours de ces descriptions, est qu'il y a une différence nette de couleur entre les isolats de *F. solani* et le *F.o.l.* Cependant, les variations de couleur entre les isolats de *F. solani* semble être aléatoire, et ne peut expliquer à elle seule la différence dans leur pouvoir pathogène de ces isolats.

En effet, les critères morphologiques, et particulièrement la couleur peuvent jouer un rôle important dans la détermination et la distinction des espèces. Ainsi BOOTH (1971) et TOUSSON et NELSON (1976), ont suggéré l'utilisation de ces critères pour la distinction des espèces appartenant au genre *Fusarium*.

ALLARD et al (1978), a aussi utilisé les critères de texture et de la couleur pour la distinction entre les trois espèces d'*Ascochyta spp.* De même STANLY et HANSAN (1966), les ont utilisé pour la taxonomie des différentes espèces d'*Erysiphe spp.*

### 3.5- COMPORTEMENT IN VITRO DE QUATRE ISOLATS DE *F.SOLANI*:

Les résultats qui sont présentés dans ce chapitre constituent approche à la connaissance des principaux facteurs abiotiques et biotiques pouvant influencer le comportement du *F. solani*.

#### 3.5.1- Action du milieu de culture sur la croissance et la sporulation :

Les résultats rapportés dans le figure 3, font apparaître des différences de comportement des quatre isolats de *F. solani* sur les différents des milieux de culture. Pour un temps donné d'incubation, un maximum de croissance mycélienne est obtenu sur le milieu Czapeck, suivi du milieu PDA et du milieu LDA. Quant au milieu Richard, il s'est montré défavorable à la croissance du *F.solani*, le milieu Malt a présenté un comportement intermédiaire.

Le test de Newman-Keuls, nous a permis de classer les milieux de cultures selon l'ordre suivant:

CZP>PDA>LDA>Malt > RICH.

Concernant le classement des différents isolats, le test de Newman-Keuls nous a permis des les regrouper en deux groupes homogènes:

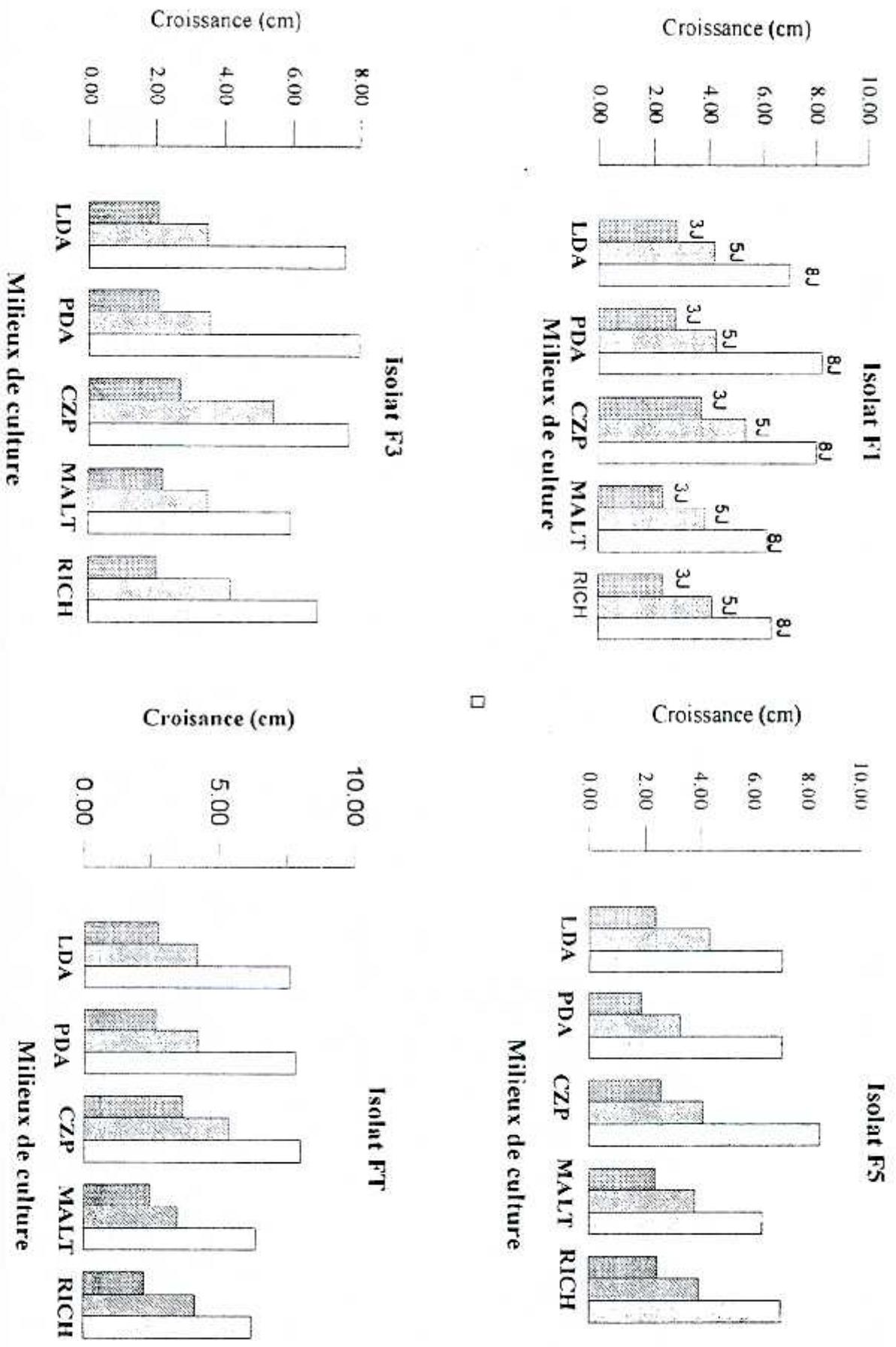
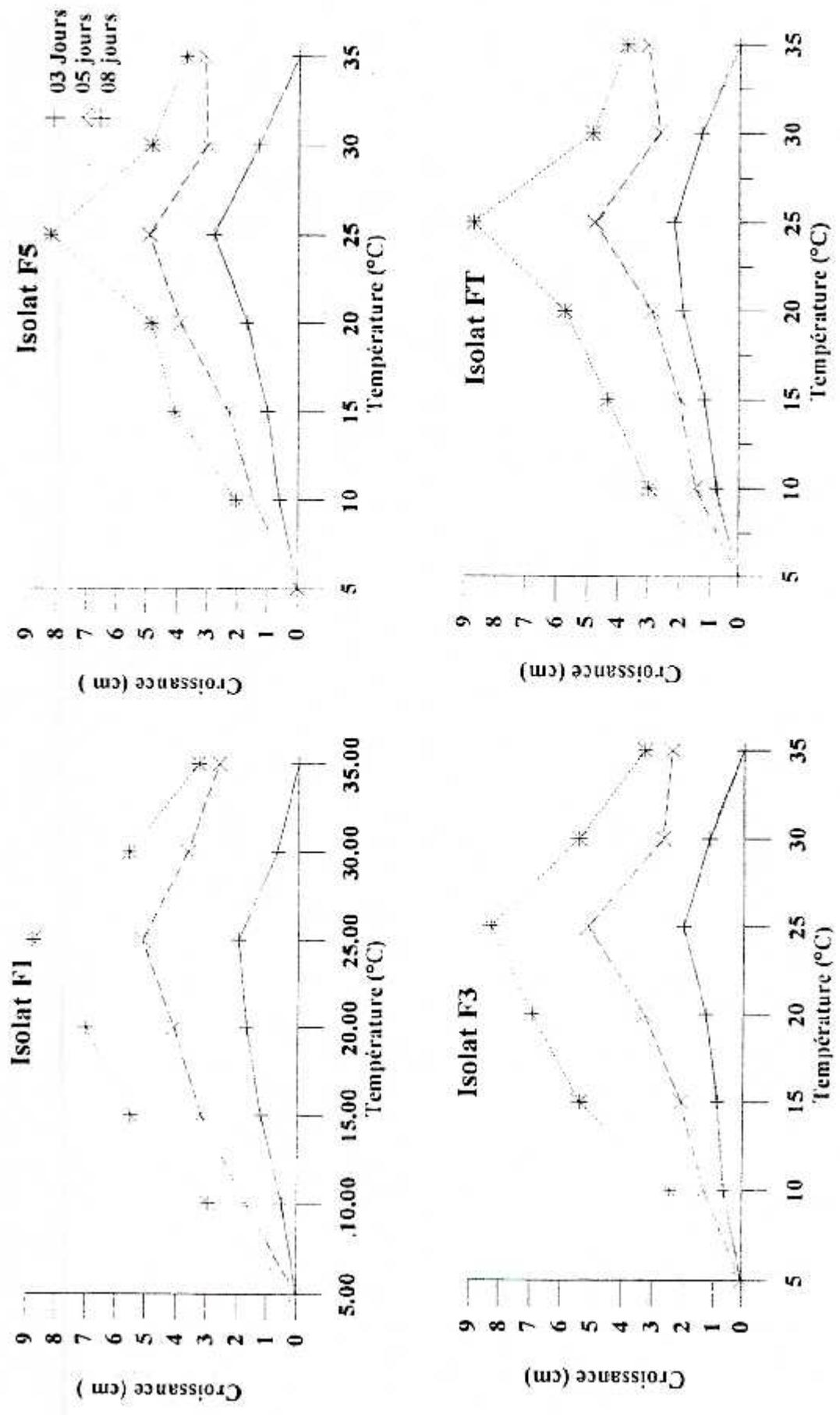


Figure 3: Influence des milieux de cultures sur la croissance mycélienne de quatre isolats de *F. solani*



**Figure 4: Influence de la température sur la croissance mycélienne de quatre isolats de *F. solani***

Premier groupe: composé de l'isolat FT et F3.

Deuxième groupe: composé de l'isolat F5 et F1.

Quant à la sporulation, celle ci s'est montrée abondante sur le milieu PDA, suivi du milieu LDA; les milieux Czapeck et Richard ont montré un comportement intermédiaire. L'analyse statistique (annexe 14) a permis le classement suivant:

PDA > LDA > RICH > CZP > Malt

Concernant le classement des isolats pour leur sporulation, ce test a permis de les classer comme suit:

Premier groupe: composé de l'isolat F5.

Deuxième groupe: composé de l'isolat F3.

Troisième groupe: composé de l'isolat F1 et FT.

### 3.5.2- Action de la température sur la croissance et la sporulation:

Cette étude comparative a été effectuée vis à vis d'une gamme de température allant de 5 à 35°C.

Les résultats obtenus (fig 4), montrent que d'une façon générale, que les quatre isolats étudiés ont une croissance qui augmente régulièrement de 5 à 25 °C, ensuite, elle diminue pour devenir nulle à 35°C.

L'optimum de croissance se situe aux alentours de 25°C, avec une température minimale de 5°C et une température maximale de 35°C. Pour cette espèce, la température de 40°C s'avère létale.

En revanche, l'exposition des isolats à une température de 5°C, ne s'avère pas létale, car le champignon reste vivant en formant des chlamydo-spores. Si on l'expose à nouveau à une température optimale, celui ci reprend sa croissance normale.

Concernant l'effet de la température sur la sporulation, on remarque que cette dernière augmente avec la température jusqu'à atteindre un optimum qui coïncide avec l'optimum de la croissance mycélienne à savoir 25°C.

L'analyse de la variance sur la croissance, a montré qu'il y' a des différences significatives entre les températures étudiées et entre les isolats ( annexe 10).

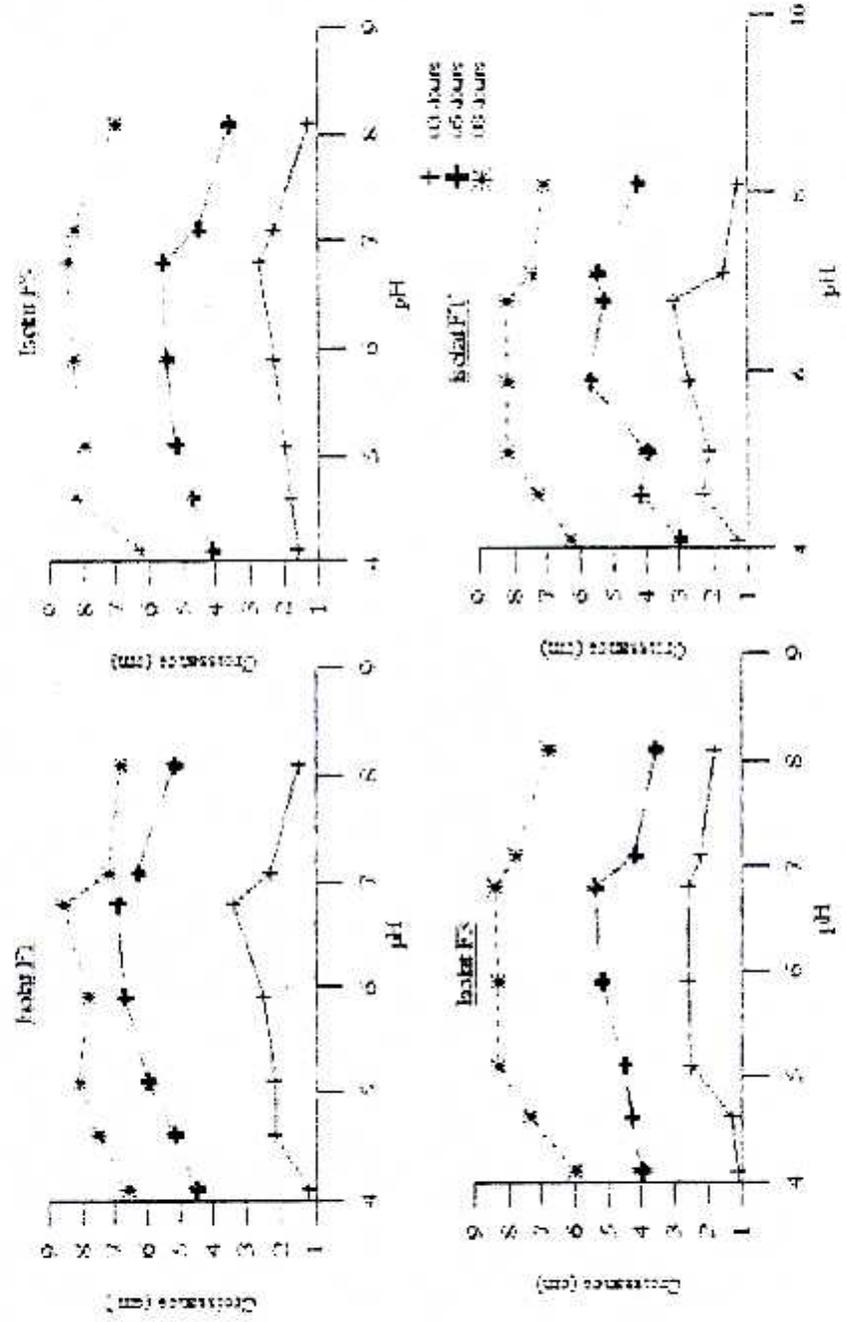


Figure 6: Influence du pH sur la croissance mycélienne de quatre isolats de *F. solani*.

Le test de Newman-Keuls, nous a permis de classer les isolats en quatre groupes distincts:

Premier groupe: comprend l'isolat F1.

Deuxième groupe: comprend l'isolat F3.

Troisième groupe: comprend l'isolat F5.

Quatrième groupe: comprend l'isolat FT.

Pour la sporulation, ce même test nous a permis de distinguer trois groupes homogènes d'isolats (annexe 13):

Premier groupe: constitue d'isolat F5.

Deuxième groupe: constitue d'isolat F3 et FT.

Troisième groupe: comprend l'isolat F1.

### **3.5.3- Action de la lumière et de l'obscurité sur la croissance et la sporulation:**

De nombreux travaux (LEACH, 1962; BLACKMAN, 1968; BOMPEIX, 1974), ont montré que la croissance mycélienne et surtout la sporulation peuvent être influencées par la présence ou l'absence de la lumière. Il en est de même pour les différentes sources de lumière visible et ultraviolette.

Les résultats obtenus dans notre essai (fig 5) ont montré une indifférence du champignon à la lumière pour son aptitude à la croissance mycélienne. La sporulation semble, elle aussi non influencée par la lumière.

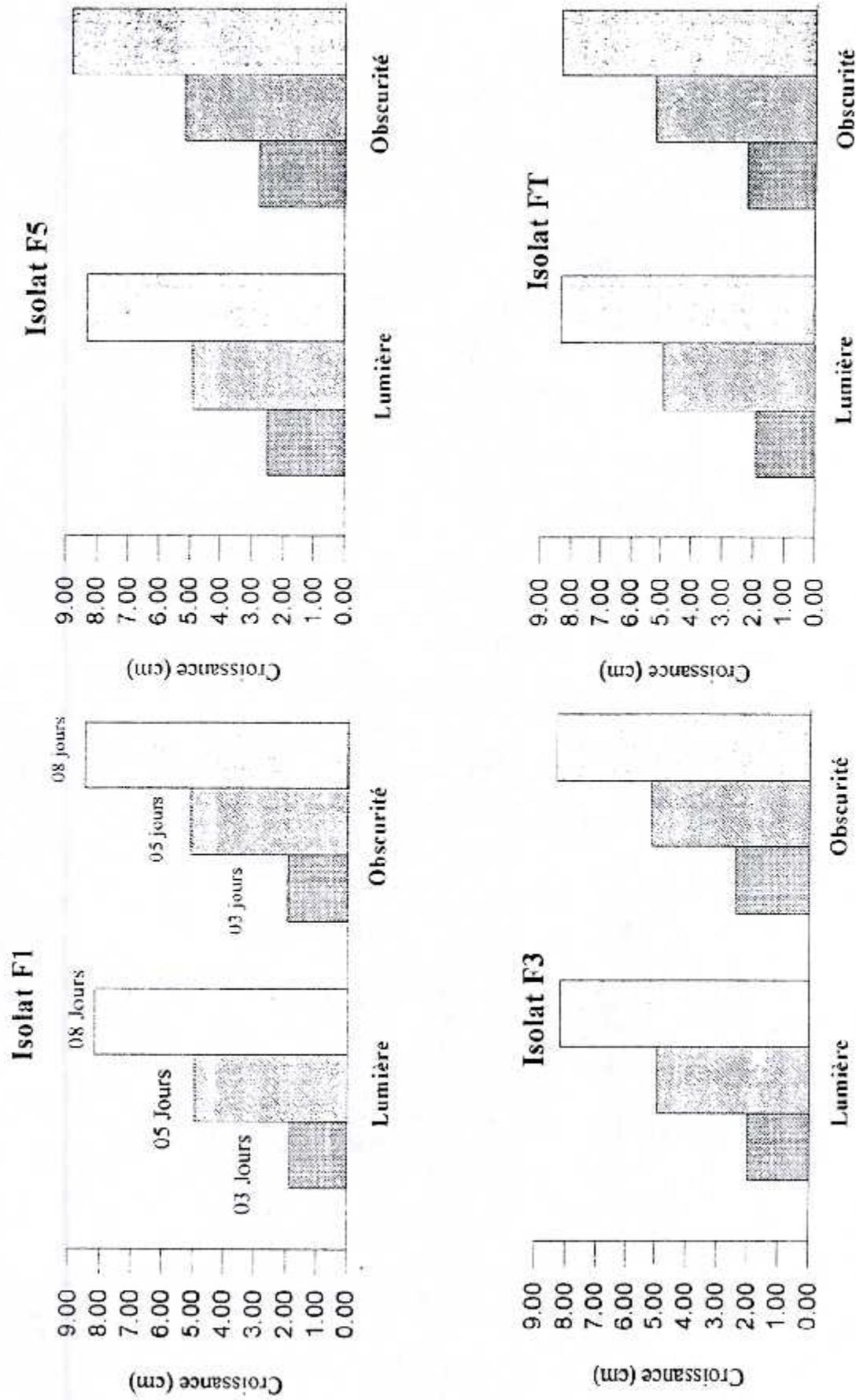
Toutefois, la lumière semble influencer le type de production de spores. Ainsi, elle semble favoriser la production des macroconidies, alors que leur production en obscurité est faible.

### **3.5.4- Action du pH sur la croissance et la sporulation**

Ces résultats obtenus montrent que l'optimum de croissance se situe entre le pH 5.9 et 6.8 (fig 6). Concernant le comportement des quatre isolats, ces derniers ont montré des différences de croissance. Ainsi le test de Newman-Keuls nous a révélé la présence de deux groupes homogènes (annexe 9 et 12):

Premier groupe: comprend l'isolat F5 et F3.

Deuxième groupe: comprend l'isolat F1 et FT.



**Figure 5: Influence de la lumière et de l'obscurité sur la croissance mycélienne des quatre isolats de *F. solani***

Quant à la sporulation, son abondance semble être liée à l'importance de la croissance mycélienne. Le test de Newman-Keuls, nous a permis de distinguer les trois groupes homogènes suivants:

Premier groupe: comprend l'isolat F5.

Deuxième groupe: comprend l'isolat F3.

Troisième groupe: comprend l'isolat F1 et FT.

### 3.5.5- Action de l'humidité relative sur la croissance et la sporulation:

Les résultats obtenus, montrent que l'optimum de croissance se situe dans un intervalle d'humidité se situant aux alentours de 84 et 95%. Alors qu'à une humidité beaucoup plus faible (14% à 50%) ou à des humidités beaucoup plus élevées (>95%), on constate une diminution de la croissance mycélienne(fig 7). L'optimum de la sporulation semble coïncider avec celui de la croissance.

L'analyse de la variance montre que les quatre isolats étudiés ont montré un comportement comparable vis à vis des différents degrés d' humidité tant pour la croissance que pour la sporulation (annexe 8 et 15).

Le test de Newman-Keuls, pour la croissance mycélienne, nous a permis de classer les isolats en trois groupes homogènes:

Premier groupe: comprend l'isolat F1.

Deuxième groupe: comprend l'isolat F5 et FT.

Troisième groupe: comprend l'isolat F3.

Ce même test, nous a permis de distinguer quatre groupes homogènes pour la sporulation:

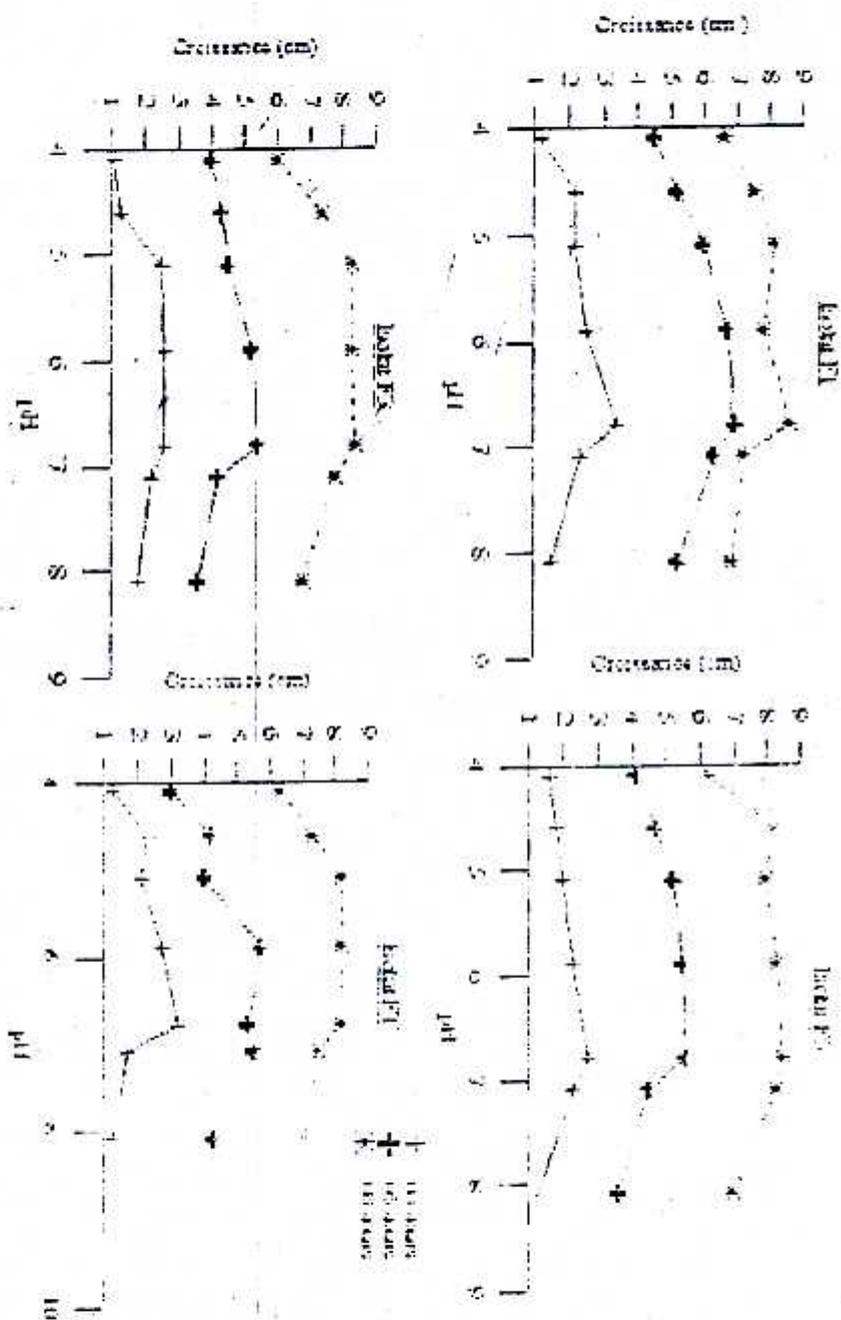
Premier groupe: comprend l'isolat F5.

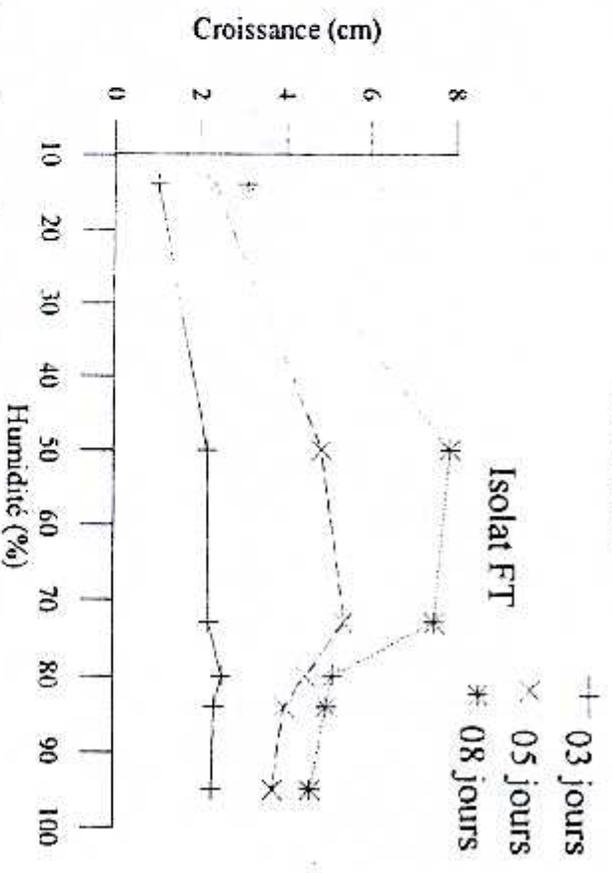
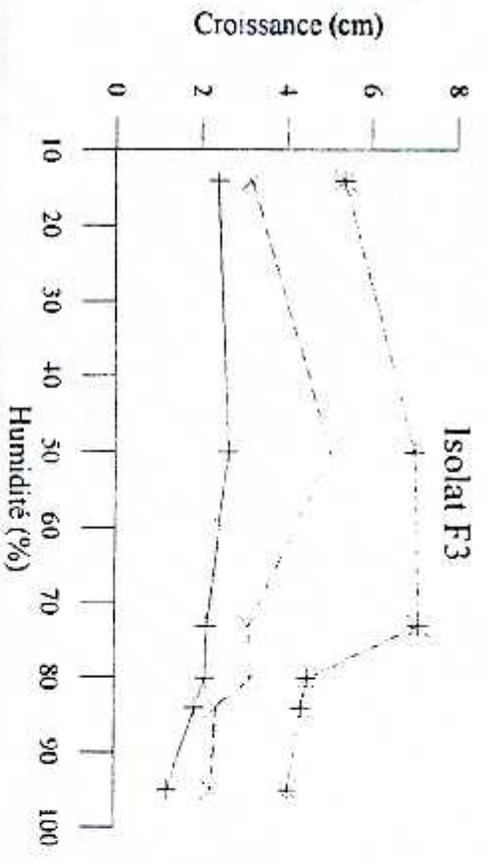
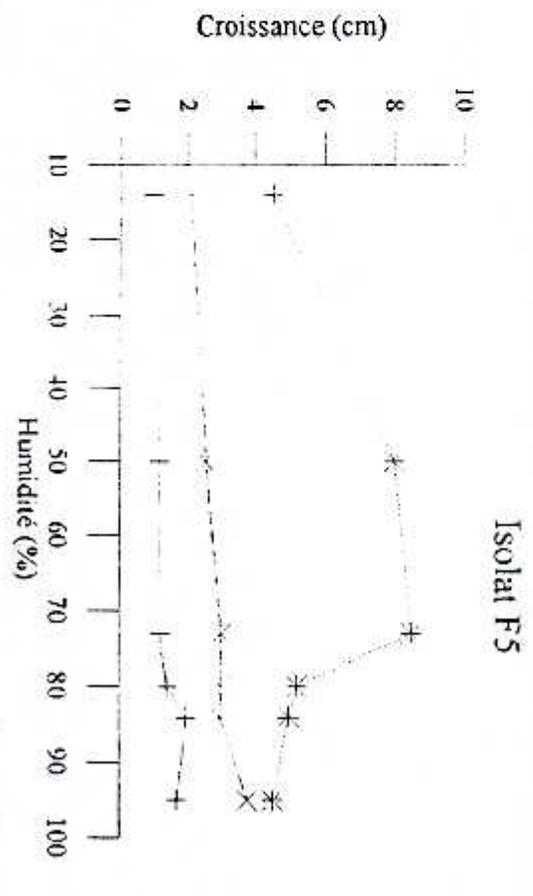
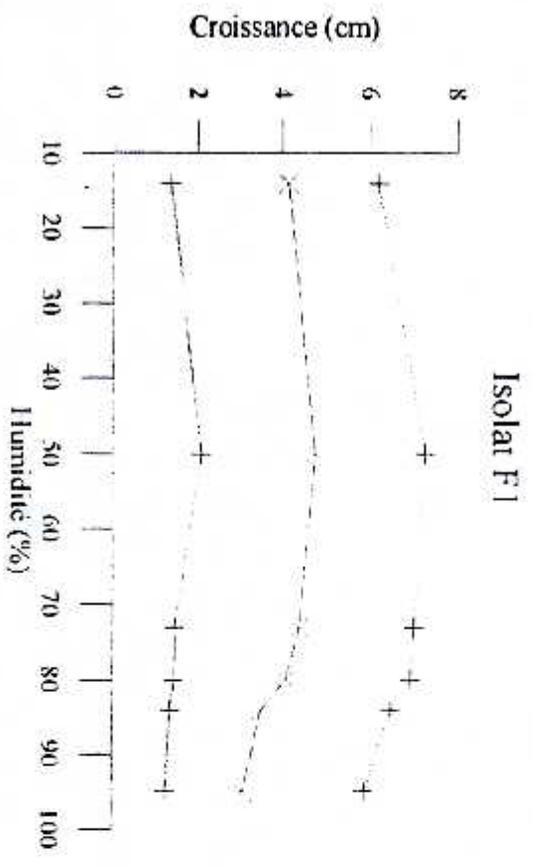
Deuxième groupe: comprend l'isolat FT.

Troisième groupe: comprend l'isolat F3.

Quatrième groupe: comprend l'isolat F1.

Figure 6: Influence du pH sur la croissance mycélienne de quatre bolets de W. scharii





**Figure 7: Influence de l'humidité sur la croissance mycélienne de quatre isolats de F.solani**

+ 03 jours  
 x 05 jours  
 \* 08 jours

## PLANCHE 5

**Figure 1: Profils electrophorétiques des estérases de quatre isolats de *F. solani* et un isolat de *F.o.l.***

**De gauche à droite, on trouve: FD- F5- F3-F1-FT.**

**Figure 2: Profils electrophorétiques des malates dehydrogénases de quatre isolats de *F. solani* et un isolat de *F.o.l.***

**De gauche à droite, on trouve: FT- FD- F5- F3- F1.**

De même, les travaux de plusieurs auteurs rapportent qu'en boîte de Pétri et sur milieu gélosé, la croissance mycélienne est optimale dans l'intervalle de température 25°C à 30°C (WALKER, 1965; KUC, 1969; MELOT et MAS, 1975; MOLOT et al, 1990). Ces mêmes auteurs ont montré que ce champignon ne se développe pas aux températures voisines de 4°C et 36°C. Ils confirment nos résultats, puisque nous avons remarqué qu'à 5°C, les isolats ne se développent pas et que les températures au delà de 35°C sont généralement létales.

Quant à la sporulation, l'action de la température a une action comparable à celle de la croissance. Des résultats similaires ont été rapportés par MOLOT et MAS (1975), qui ont montré que le pouvoir pathogène était stimulé par des températures moyennes (22°C), mais qu'aux fortes températures (36°C), la plante est infectée sans présenter des symptômes.

Le troisième facteur étudié, est l'action de la lumière sur le comportement du *F. solani*, a été précisée. Contrairement à certaines espèces très exigeantes en lumière pour la sporulation (LEACH, 1962; BLACKMAN, 1968; BOMPEIX, 1974), tous les résultats obtenus montrent que le *F. solani* peut pousser indifféremment en présence ou en absence de lumière. Néanmoins, l'intensité de la sporulation peut être modifiée à des proportions variables, par ce facteur.

Concernant l'action de l'humidité sur la croissance et la sporulation du *F. solani*, ce dernier semble croître sur toute une gamme d'humidité, allant de 50 à 84%. Ces résultats rejoignent ceux de plusieurs auteurs (KHARE et al, 1975; SHARMA et al, 1978). Ainsi, BHATTI et KRAFT (1992), ont noté que l'augmentation du taux d'humidité est toujours lié à une sévérité accrue de la pourriture racinaire due au *F. solani* et *R. solani*. Ces mêmes résultats ont été rapportés précédemment par CHAUHAN (1963) in BHATTI et KRAFT (1992).

Comme dernier facteur abiotique étudié, l'action du pH s'est révélée comme un facteur de grande importance pour le développement du champignon. Il agit surtout au niveau de la croissance mycélienne (BREWER, 1962; LEACH, 1962; ODUNFA, 1984), ce qui est confirmé par nos résultats. En effet un pH de 5.9 constitue une valeur optimale aussi bien pour la croissance mycélienne que pour la sporulation.

### 3.6- ETUDE DU POLYMORPHISME ISOENZYMATIQUE DES ISOLATS DE *F.SOLANI* ET *F.O.L.*: ANALYSE DES ESTERASES ET DES MALATES DEHYDROGENASES.

L'activité enzymatique est détectée à partir de l'extrait de mycélium de différents isolats de *F.solani* et de *F.o.l.*

Dans notre, étude le polymorphisme enzymatique des différents isolats, est comparée aux variations morphologiques et au comportement pathologique de ces isolats.

#### 3.6.1- Les estérases :

Pour tous les isolats étudiés de *F. solani*, des zymogrammes comparables d'estérases sont obtenus sur gel polyacrylamide. Ils diffèrent avec ceux de l'isolat de *F.o.l.* Le nombre de bandes rencontrées dans les différents systèmes enzymatiques sont présentés dans le tableau 17 et figure 8a.

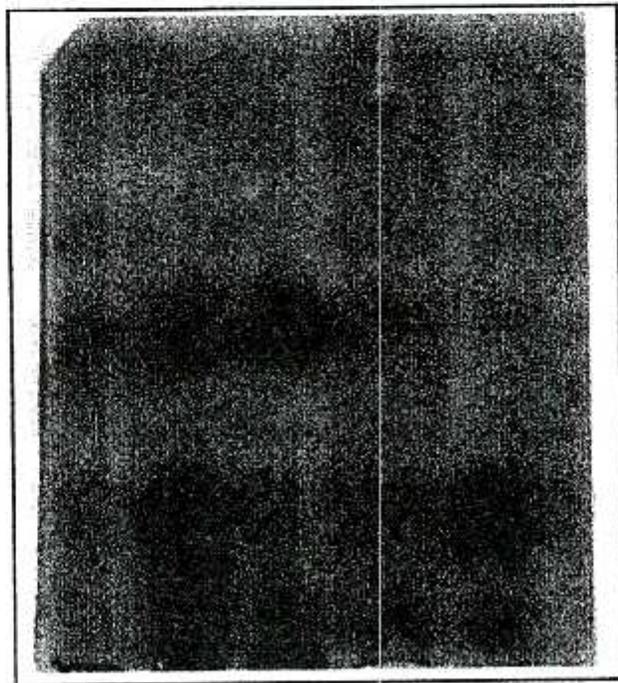
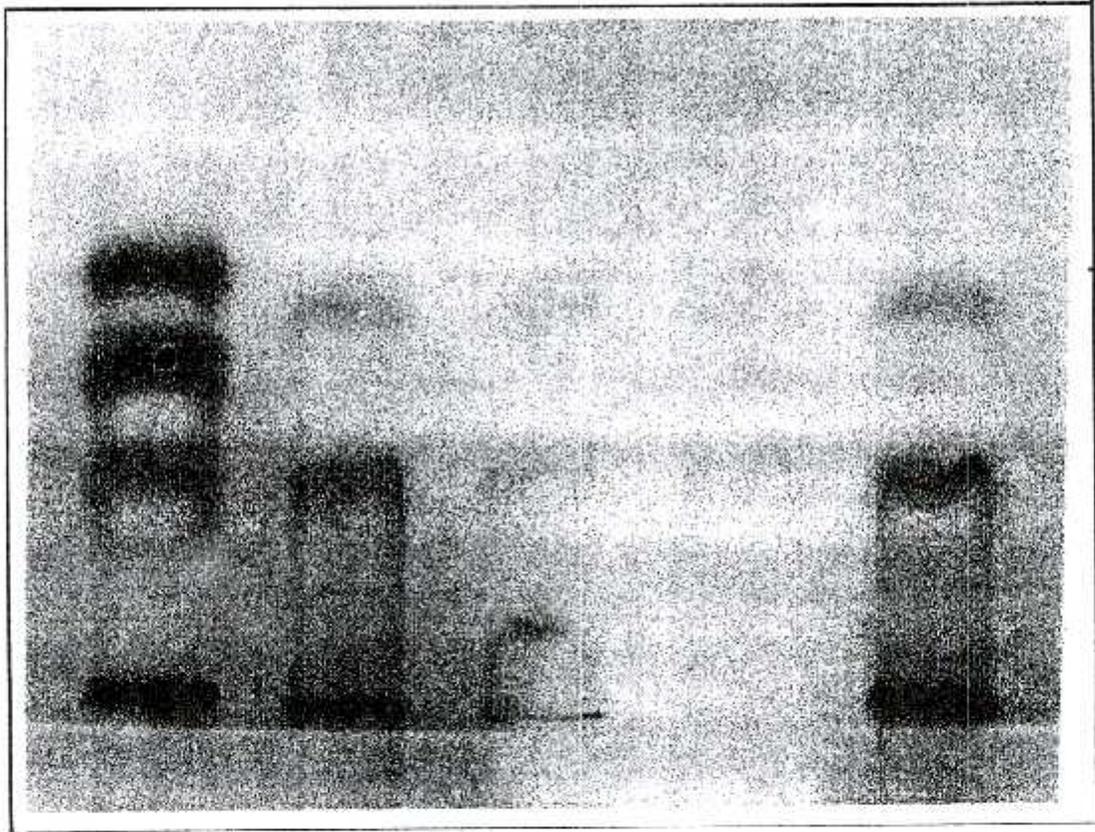
**Tableau 17: Présentation du nombre de bandes électrophorétiques des 4 isolats de *F. solani* et celles de *F.o.l.*:**

Nombre de bande sur gels polyacrylamide avec  
extraits des isolats

Isolat	F1	F3	F5	FT	FD
Système enzymatique					
Estérases	2	2	2	2	4
Malates déhydrogénase	0	2	1	1	3

Ces bandes sont numérotées de 1 à 4 (fig 8a, pl 5) dans l'ordre décroissant de la mobilité électrophorétique; les bandes observées sont uniquement notées selon l'ordre de leur présence ou de leur absence, de leur épaisseur et de leur intensité de coloration.

PLANCHE 5



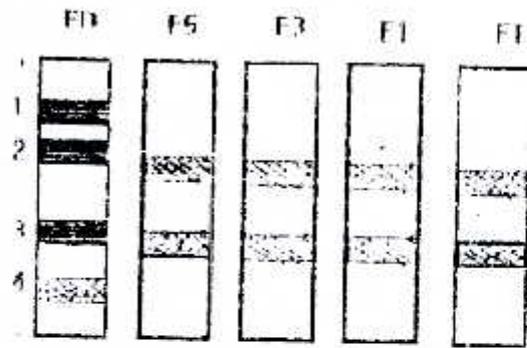


Fig 8a : Zymogrammes des estérases

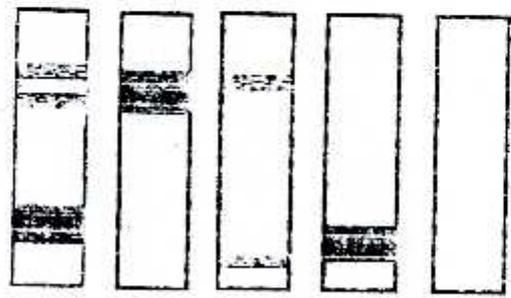


Fig 8 b : Zymogrammes des malates dehydrogénases  
 intensité de la coloration des bandes :

■ 100%    ▨ 50%    □ 25%

En considérant ces critères, nous avons regroupé les quatre isolats de *F.solani* et celui de *F.o.l.* en trois groupes distincts:

Groupe 1: Comprend deux bandes bien distinctes, épaisses et ayant une intensité de coloration moyenne. La première et la quatrième bande étant absente. Ce groupe étant représenté par F5 et FT.

Groupe 2: Comprend également deux bandes, bien visibles et épaisses; leur intensité de coloration est faible. La première et la quatrième étant absente. Ce groupe étant représenté par l'isolat F3.

Groupe 3: Comprend quatre bandes, dont les trois premières sont très intenses et faiblement épaisses. La quatrième bande étant faiblement colorée et faiblement visible. Ce groupe est représenté par l'isolat FD.

### 3.6.2- Les malates déhydrogénases:

Les malates déhydrogénases révélées sont des protéines de haut poids moléculaire, elles présentent une seule bande épaisse sur gel de polyacrylamide.

Ce système enzymatique a permis de classer les isolats en cinq groupes distincts. Le maximum de bandes est de trois, observé chez le *F.o.l.* (tableau 17).

Comme pour les estérases, les bandes sont numérotées de 1 à 3 dans l'ordre décroissant de leur mobilité électrophorétique (fig 8b, Pl.5). Aucune bande n'a pu être focalisée pour l'isolat F1.

### 3.6.3- Discussion et conclusion :

L'analyse du polymorphisme isoenzymatique semble être un outil très intéressant pour l'identification des isolats.

Le groupe des estérases renferme les enzymes, dont le rôle est limité à l'hydrolyse des esters d'alcools, des phénols et d'acides gras. Elles hydrolysent spécifiquement les liaisons esters. Ces enzymes sont constitutives et extra cellulaires, avec un pH d'activité optimal voisin de la neutralité ( pH 6.7 à 7.8 ). (GUEZLANE,1976).

Les deux systèmes enzymatiques étudiés, à savoir les estérases et les malates déhydrogénases, nous ont permis de détecter quelques différences entre les isolats de *F. solani* d'une part et entre et l'isolat de *F.o.l.* et le *F. solani* d'autre part.

Plusieurs études menées sur les variations électrophorétiques chez d'autres agents phytopathogènes, ont montré que ces deux systèmes enzymatiques sont très très intéressants pour l'étude du polymorphisme interspécifique (SIMCOX et al, 1992).

En effet, le *F. solani* et le *F.o.l.* sont deux espèces qui présentent une large hétérogénéité dans la morphologie et dans la pathogénicité des isolats. Cependant, au sein d'une même espèce, il est très difficile de distinguer des différences entre les isolats ou les formes spéciales et encore moins entre les races. De plus, très peu d'études ont montré la relation entre les caractéristiques morphologiques et les caractéristiques biochimiques (OTROSINA et al, 1987; BONDE et al, 1988). Par contre, de nombreux travaux ont montré la relation étroite entre les systèmes enzymatiques et la virulence des isolats (LINDE et al, 1990; LINNEE et BURDON, 1990).

Dans notre cas, les zymogrammes obtenus des estérases n'a permis de déceler qu'un nombre restreint de bandes (maximum quatre) chez le *F.o.l.* et deux seulement chez les isolats de *F. solani* (fig 9 et 10). Par contre, chez ces derniers, des différences au niveau de l'épaisseur des bandes et l'intensité de leur coloration ont pu être relevées.

Si les estérases nous ont permis de distinguer des variations inter spécifiques, les malates déhydrogénases nous ont permis de détecter des variations intraspécifiques, c'est à dire entre les isolats de *F. solani*.

Ainsi MEYER et al (1964), travaillant seulement sur un seul isolat de neuf formes spéciales de *F. oxysporum*, a suggéré que l'estérase peut être un moyen efficace pour la distinction entre les différentes formes spéciales de *F. oxysporum*.

Cependant, d'autres études ultérieures faites par MEYER et RENARD (1969), sur les estérases de neuf isolats de *F.o. melonis* et *F.o. elaeidis*, révèlent que des variations importantes existent entre les isolats de la même espèce, comparables à celles existantes entre les formes spéciales elles mêmes.

Cette hétérogénéité a été également constatée chez d'autres espèces, puisque des différences de zymogrammes d'estérases ont été notées chez différents isolats de *Aspergillus niger* et chez différentes races de *F.oxysporum. melonis* (NELSON et GRABER, 1967). Des travaux similaires sur quelques formes spéciales de *F. oxysporum* (GUEZLANE 1976), ont montré des différences de zymogrammes pour les estérases et les phosphatases, aussi bien entre les souches d'une même forme spéciale qu'entre les formes spéciales elles-mêmes. Ces différences entre les souches sont parfois plus importantes que celles existantes entre les différentes formes spéciales. Ainsi, cet même auteur considère que ces deux systèmes enzymatiques demeurent un moyen efficace pour la distinction entre les différentes espèces. Dans notre cas une nette différence entre le *F.o.l.* et le *F. solani* est observée. Ceci est vrai aussi bien pour les zymogrammes des estérases que ceux des malates déhydrogénases.

Cependant, il reste très difficile d'établir un lien étroit entre l'agressivité des isolats de *F. solani* et l'analyse enzymatique des estérases, et encore moins celles des malates déhydrogénases. C'est pourquoi REDDY et STAHMANN(1972), proposaient l'utilisation des estérases en combinaison avec d'autres systèmes enzymatiques pour étudier les formes spéciales ou des races.

De même, MARRISSON et al, (1989), JULIAN et LUCAS, (1990), KOCH et KOHLER, (1990) et LABDI, (1991) suggèrent des études complémentaires visant un nombre plus important de systèmes enzymatiques pour mettre en évidence un polymorphisme entre différents isolats.

### **3.7-ETUDE DU COMPORTEMENT VARIETAL ET DE LA SPECIFICITE PARASITAIRE DES DIFFERENTS ISOLATS:**

#### **3.7.1- COMPORTEMENT DES VARIETES DE LENTILLE VIS A VIS DES ISOLATS DE *F.SOLANI* ET DE *F.O.L.*:**

Tout le matériel végétal inoculé a montré une réaction positive vis à vis de tous les isolats après 20 jours avec des degrés d'attaque allant de 15% chez la variété Métropole à l'égard de l'isolat F3, à 45% chez la variété 76TA124.

Au cours du temps, la sévérité a évolué chez toutes les variétés et ce pour tous les isolats jusqu'à la fin de l'expérimentation, soit 45 jours après l'inoculation. On a noté aussi, l'absence de germination des graines chez la majorité des variétés inoculées, dont le taux varie de 3% à 5 % chez les variétés Balkan, Syrie 229 et F84-19L.

Ce comportement a été observé chez les témoins où les graines ont montré une pourriture associée à la présence de mycélium recouvrant toute la surface de la graine. Le transfert de ces graines sur milieu PDA, a permis de confirmer l'agent pathogène qui est *Fusarium*.

Sur le plan symptomatologique, toutes les plantes inoculées avec tous les isolats de *F. solani* ont présenté des symptômes de pourritures racinaires. Ces symptômes sont très visibles vers le 30<sup>ème</sup> jour après inoculation; la sévérité de ces lésions est directement liée avec les symptômes foliaires.

Dans certains cas, nous avons remarqué que les plantes ayant une croissance normale ou montrant de légers jaunissements ou nécroses des feuilles basales, ont un système racinaire bien développé, presque similaire à celui des plantes témoins; c'est le cas de l'interaction Métropole-F3 et Métropole-FT.

Par contre, les plantes présentant des symptômes plus sévères et un faible développement, possèdent un système racinaire moins développé par rapport au témoin. Dans ce dernier cas, les lésions nécrotiques affectent plus sévèrement le collet et les racines, suivi d'une pourriture noire des racines.

L'analyse de la variance des résultats obtenus après 45 jours d'inoculation (annexe 21), a montré des différences significatives aussi bien entre les variétés qu'entre les isolats.

Quant au pouvoir pathogène des quatre isolats inoculés sur les 11 variétés de lentille, le test de Newman-Keuls, classe les isolats en trois groupes homogènes comme suit:

Premier groupe: comporte l'isolat F5.

Deuxième groupe :comporte l'isolat FT et F1.

Troisième groupe :comporte l'isolat F3.

Ce même test nous a permis de classer les variétés selon leur degré d'attaque, en six groupes homogènes:

Premier groupe: la variété 76TA124.

Deuxième groupe: la variété LV141, LV149A,

Troisième groupe: la variété Balkan, Syrie et ILL8.

Quatrième groupe: la variété F86-16L, ILL 4400, F84-19L, ILL 16.

Cinquième groupe: la variété Métropole.

Nous signalons que les variétés attaquées par le *F. solani*, ont présenté un degré beaucoup plus élevé que lorsqu'elles sont inoculées par l'isolat FD, agent responsable du flétrissement vasculaire de la lentille. Ce degré n'a guère dépassé les 49%, alors qu'il a atteint jusqu'à 85 % chez la variété 76TA124 inoculée par l'isolat F5, agent de pourriture racinaire (fig 9).

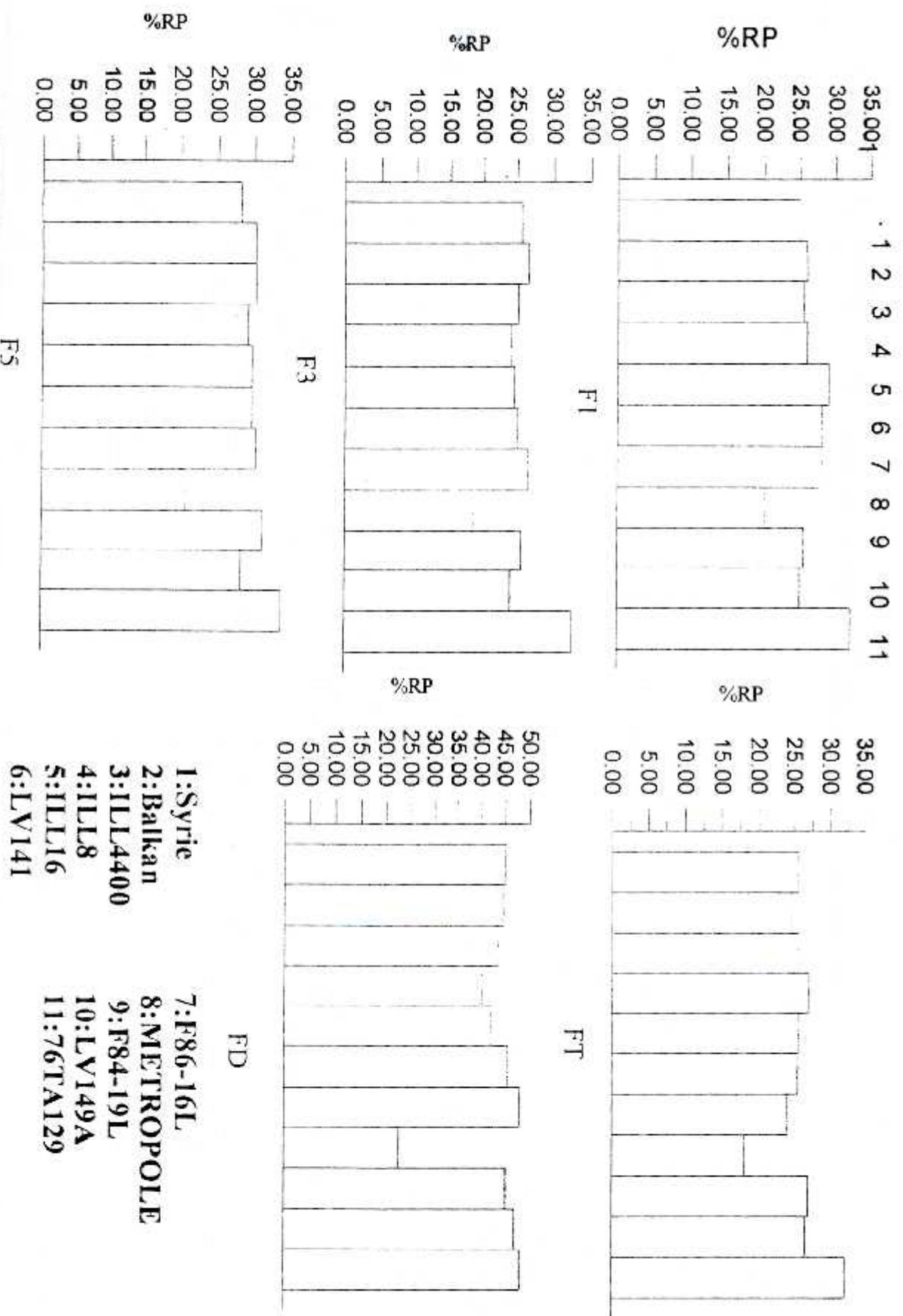
Quant au pourcentage de réisolement de l'agent responsable à partir des organes attaqués, il semble y avoir un lien avec le degré de sévérité de la maladie (fig 10).

En effet, nous avons noté un pourcentage élevé de l'agent pathogène chez les variétés qui ont montré le plus fort degré d'attaque. Par exemple, la variété 76TA124 a présenté le pourcentage de réisolement du champignon le plus élevé avec une valeur de 33.7% et un taux le plus bas dans le cas d'une variété résistante confronté à un isolat moins agressif. C'est le cas de la variété Métropole inoculée par l'isolat F3.

Les mêmes observations sont notés pour l'isolat *F.o.l.* où on a noté des pourcentages plus élevés lors de l'isolement de l'agent pathogène aussi bien des racines que de la tige.

Ainsi le taux le plus élevé de réisolement du *F.o.l.* a été noté chez les variétés qui ont montré le degré d'attaque le plus élevé, soit 48% chez les variétés F86-16L et 76TA124 et un taux assez faible chez la variété Métropole.

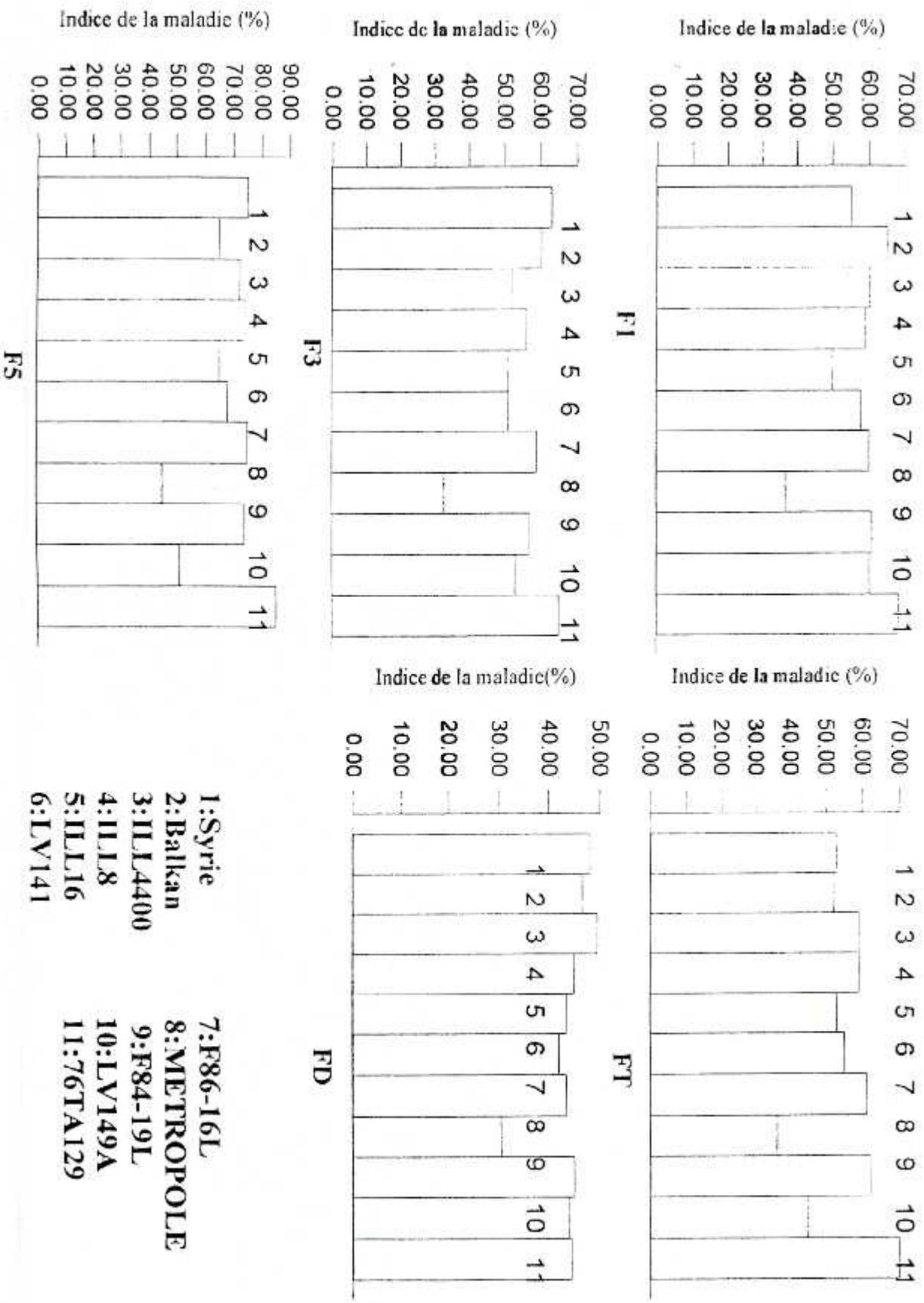
Quant à la différence symptomatologique des parties aériennes, peu de différences ont été notées chez le *F. solani* et le *F.o.l.*, et ceci pour toute les variétés testées. Ces deux agents provoquent des symptômes externes similaires, un jaunissement accompagné parfois d'un flétrissement. Toutefois, au niveau du système racinaire, le *F. solani* provoque des pourritures ou des nécroses typiques, alors que le *F.o.l.* n'entraîne aucun symptôme de ce genre. Une autre différence, l'isolement du



**Fig 10: Pourcentage de reisolement (%RP) de quatre isolats de F.solani et un isolat de F.o.lentis à partir de 11 variétés de lentille**

- |                  |                    |
|------------------|--------------------|
| <b>1:Syrie</b>   | <b>7:F86-16L</b>   |
| <b>2:Balkan</b>  | <b>8:METROPOLE</b> |
| <b>3:ILL4400</b> | <b>9:F84-19L</b>   |
| <b>4:ILL8</b>    | <b>10:LV149A</b>   |
| <b>5:ILL16</b>   | <b>11:76TA129</b>  |
| <b>6:LV141</b>   |                    |

FD



- 1: Syrie
- 2: Balkan
- 3: ILL4400
- 4: ILL8
- 5: ILL16
- 6: LV141
- 7: F86-16L
- 8: METROPOLE
- 9: F84-19L
- 10: LV149A
- 11: 76TA129

Figure 9: Le pourcentage du degré d'attaque (%IM) de quatre isolats de *F. solani* et un isolat de *F. olerantis* sur 11 variétés de lentille

## PLANCHE 6

Figure 1: Symptômes causés par *F.o.l.* sur la lentille (Var: Syrie 229).

Figure 2: Symptômes causés par *F.o.l.* sur la lentille (Var: Métropole).

Figure 3: Symptômes causés par *F.o.l.* sur la lentille (Var: Balkan 755).

# PLANCHE 6

## PLANCHE 7

Figure 1: Symptômes causés par les quatre isolats de *F. solani* sur la lentille (Var: Syrie 229)

de gauche à droite, on trouve:

Témoin - F1 - FT - F3 - F5.

Figure 2: Symptômes causées par les quatre isolats de *F. solani* sur lentille (Var: Métropole).

de gauche à droite, on trouve:

Témoin - F1 - FT - F3 - F5.

Figure 3: Symptômes causés par les quatre isolats de *F. solani* sur la lentille (Var: 76TA124).

de gauche à droite, on trouve:

Témoin - F1 - FT - F3 - F5.

PLANCHE 7

*F.o.l.* est obtenu aussi bien à partir des racines que de tiges, alors que la présence du *F.solani*, est localisée seulement au niveau du système racinaire.

### 3.7.2- SPECIFICITE PARASITAIRE DE *F.SOLANI* ET DE *F. O. L.*:

L'aptitude des *F. solani* et *F.o.l.* à attaquer les autres légumineuses a été menée par inoculation artificielle. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 17. En effet, l'isolat du *F.o.l.* (FD), a montré des symptômes typiques de flétrissement uniquement sur la lentille. Par contre, les isolats de *F. solani* ont provoqué des symptômes de pourritures aussi bien sur la lentille que sur les autres légumineuses, avec cependant des degrés différents. Les symptômes sont variables: jaunissement et flétrissement avec présence parfois de nécroses racinaires. Quant aux autres espèces comme le blé dur et la tomate, celles ci n'ont présenté aucun symptôme visible. Le réisolement de l'agent pathogène n'a été que très faible, ne dépassait guère les 5%.

L'analyse de la variance a montré des différences aussi bien entre les isolats, qu'entre les espèces hôtes testées (annexe 20).

Ainsi, le test de Newman-Keuls nous a permis de distinguer deux groupes d'isolats de *F. solani*:

Premier groupe: de l'isolat F5.

Deuxième groupe: l'isolat F3, FT et F1.

Concernant, les espèces inoculées, ce même test a révélé trois groupes homogènes, selon leur degré d'attaque:

Premier groupe: la lentille, pois chiche, pois.

Deuxième groupe: la fève et l'haricot.

Troisième groupe: le blé dur et la tomate.

Tableau 18: Pourcentage d'attaque de quelques espèces de plantes inoculées par quatre isolats de *F. solani* et un isolat de *F.o.l.* (45 jours après inoculation).

Hôtes	Isolats	F1	F3	F5	FT	FD
<i>Lens esculentum</i>		55%	53%	75%	55%	48%
<i>Cicer arietinum</i>		55%	52%	50%	55%	08%
<i>Phaseolus vulgaris</i>		42%	39%	50%	45%	08%
<i>Vicia Faba</i>		40%	40%	52%	50%	05%
<i>Pisum sativum</i>		55%	50%	65%	55%	05.5%
<i>Lycopersicum esculentum</i>		04%	04%	05%	03%	05.5%
<i>Triticum vulgare</i>		05%	04.5%	04.5%	04.5%	0.6%

Le réisolement du *F. solani*, est réalisé à partir du système racinaire chez toutes les espèces testées, y compris la tomate et la céréale, mais les degrés restent très faibles dépassant rarement les 5% chez les espèces botaniquement éloignées (tableau 19).

De même, le réisolement du *F.o.l* a été positif, à partir des autres espèces végétales testées autre que la lentille, sans pour autant produire de symptômes visibles.

Tableau 19: Pourcentage de réisolement (%RP) de l'agent pathogène à partir de quelques espèces végétales (45 jours après inoculation)

Isolat	%RP	Espèces					
		<i>Lens esculentum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Vicia Faba</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i>	<i>Triticum vulgare</i>
F1	Racine	30	25	35	20	05	02
	Tige	00	00	00	00	00	00
F3	Racine	33	20	35	18	04	2.5
	Tige	00	00	00	00	00	00
F5	Racine	40	28	38	20	04	2.5
	Tige	00	00	00	00	00	00
FT	Racine	28	25	30	18	05.5	05
	Tige	00	00	00	00	00	00
FD	Racine	00	05	06	5.5	5.5	05.5
	Tige	50	00	01	00	00	00

## PLANCHE 8

Figure 1: symptômes sur système racinaire causé par *F. solani* (à droite) sur la lentille ( Var: Syrie 229).

Figure 2: Symptômes de pourriture racinaire sur quatre espèces de légumineuses causés par *F. solani* ( Isolat F5).

De gauche à droite, on trouve:

Blé- Tomate- Fève- Pois chiche- Lenille- Pois.

**PLANCHE 8**

## PLANCHE 9

Figure 1: Symptômes de jaunissement et de flétrissement sur le pois (*Pisum sativum*) causés par le *Fusarium solani* (isolat F5).

Figure 2: Symptômes de jaunissement et de flétrissement sur quelques espèces de légumineuses causés par le *Fusarium solani*.  
De gauche à droite, on trouve:  
Pois- Blé- Tomate- Pois chiche- Fève.

PLANCHE 9.

### 3.7.3- Discussion et conclusion:

Les notations individuelles réalisées sur chaque plantule, nous ont permis d'exprimer par un pourcentage, la réaction globale des 11 variétés de lentille pour leur comportement à l'égard de quatre isolats de *F. solani* et un isolat de *F.o.l.*

L'analyse détaillée de ces résultats en établissant le classement de toutes les variétés selon les indices d'attaque (fig 9), permet de constater que généralement l'ordre ne varie pas d'un isolat à un autre.

En effet, plusieurs études menées aussi bien chez le *F. solani* que chez le *F.o.l.* ont montré l'existence de races physiologiques. Ainsi, il est recensé en Inde sept races physiologiques de *F.o.l.* (KANNAIYAN et NENE, 1978).

L'absence dans notre expérimentation de races physiologiques de références des deux espèces, ainsi que l'absence de variétés différentielles standard ont été les principales insuffisances pour comparer nos isolats et voir s'il s'agit de la mêmes races ou bien de races totalement différentes.

Selon VAN DER PLANK(1968), la présence de races physiologiques permet de mettre en évidence la présence de différents gènes de résistance au niveau des variétés hôtes ainsi que la présence de différents gènes de virulence au niveau des isolats.

Dans notre cas, l'étude menée sur le comportement variétal de 11 variétés de lentille, nous a permis de reproduire les symptômes; ces symptômes causés par le *F. solani* sont en fait ceux décrits par plusieurs auteurs ( ALAVAREZ et MORENO,1984;WUSTERLUND et al, 1974; TRAPERO-CASAS et JIMINENEZ-Díaz, 1985 a,b), à savoir:

-Jaunissement foliaire et parfois un flétrissement accompagné d'un dessèchement des feuilles basales;

-Noircissement du collet et des racines;

-Décoloration vasculaire du système racinaire;

-Réduction de la croissance.

Quant aux symptômes causés par le *F.o.l.*, il s'agit d'un flétrissement et parfois d'un jaunissement accompagné d'une décoloration vasculaire au niveau des racines et

de la tige comme décrit par ALAVAREZ et MORENO(1984), WUSTERLUND et al, (1974); TRAPERO-CASAS et JIMINENEZ-DIAZ, (1985a,b). Selon le système de notation établi par TRAPERO-CASAS et JIMENEZ.-DIAZ (1985) pour l'évaluation de la résistance du pois chiche à l'égard du *F.o.ciceris.*, est considérée résistante, toute variété ayant un degré d'attaque inférieur à 20%. Lorsque ce degré dépasse les 40%, la variété est considérée comme sensible. Aussi, lorsque ce degré se trouve dans l'intervalle 20 % à 40%, la variété est considérée comme moyennement résistante. Donc, en se référant à ce système, la seule variété qui peut être considérée comme résistante est la variété Métropole. En effet, cette dernière est une variété locale très cultivée par nos agriculteurs, en raison de ses capacités agronomiques et de ses qualités culinaires très appréciées.

Les autres variétés introduites dans le cadre des essais de comportement menées par l'I.T.G.C en collaboration avec l'I.C.A.R.D.A, se sont montrées toutes sensibles, aussi bien à l'agent de la pourriture qu'à l'agent de flétrissement vasculaire, avec des degrés d'attaque très élevés atteignant parfois les 85 % chez la variété 76TA124.

Concernant, la spécificité parasitaire des différents isolats étudiés, nous avons montré que le *F.o.l.* est un agent très spécifique attaquant seulement la lentille. Il peut cependant infecter les autres espèces mais sans provoquer des symptômes visibles. Antérieurement, HAWARE et NENE (1982), ont montré que le *F.o.l.* est pathogène seulement sur la culture de la lentille et qu'il peut parasiter les racines de plusieurs espèces de plantes cultivées et de mauvaises herbes (pois chiche, haricot, melon, luzerne,...).

Concernant, le *F. solani*, responsable de la pourriture racinaire, nous avons constaté une polyphagie marquée sur les autres légumineuses, particulièrement sur pois et pois chiche.

En effet, selon la gravité des dégâts causés par ces isolats sur le pois, nous pouvons affirmer que la forme spéciale étudiée serait du *Fusarium solani*(Mart) Sacc *f.sp.pisi* (Jones)Snyd.& Hans(KRAFT,1969). Selon ce même auteur, cette forme spéciale compte quatre races physiologiques.

Une forme spéciale qui est beaucoup rapportée dans la littérature et qui cause des dégâts non négligeable sur les légumineuses, est le *Fusarium solani f.sp.phaseoli*, dont les dégâts sont très importants sur fève et haricot, et à moindre degré sur les autres légumineuses (KRAFT, 1969).

### 3.8- IMPORTANCE DE POLYPHENOLS ET DE CERTAINS OXYDASES DANS LE MECANISME DE RESISTANCE:

#### 3.8.1- Résultats:

Les résultats obtenus (fig 11) montrent l'importance de certains polyphénols et certains oxydases, dans le phénomène de résistance. Une augmentation de l'activité peroxydasique, de la polyphénoloxydase et des polyphénols est constatée chez toutes les plantes inoculées, qu'elle que soit la réaction vis à vis de l'agent pathogène (sensible ou résistante).

Toutefois l'activité de la peroxydase et de la polyphénoloxydase s'est montrée très importante chez la variété résistante (variété Métropole) par rapport à la variété sensible (76TA124) avec ou sans inoculation.

Quant à l'analyse de la variance, elle nous a montré des différences en peroxydase, polyphénoloxydase et polyphénols aussi bien entre les isolats et les variétés, qu'au niveau de leur l'interaction hôte- pathogène (annexe 23 et 24). Ainsi le test de Newman-Keuls, a permis de distinguer au niveau de l'interaction isolat-variété, les groupes homogènes suivants:

- Pour la teneur en PPO et PO, le classement s'établie comme suit:

Met-F5 > Met-F3 > Met-Temoin > 76TA124-F5 > 76TA124-F3 > 76TA124-Temoin.

-Pour la catalase et de l'acide ascorbique oxydase, celles ci semblent suivre une évolution négative (fig 11). Nous remarquons que les plantes témoins semblent être les mieux pourvues en ces enzymes contrairement aux PPO et PO.

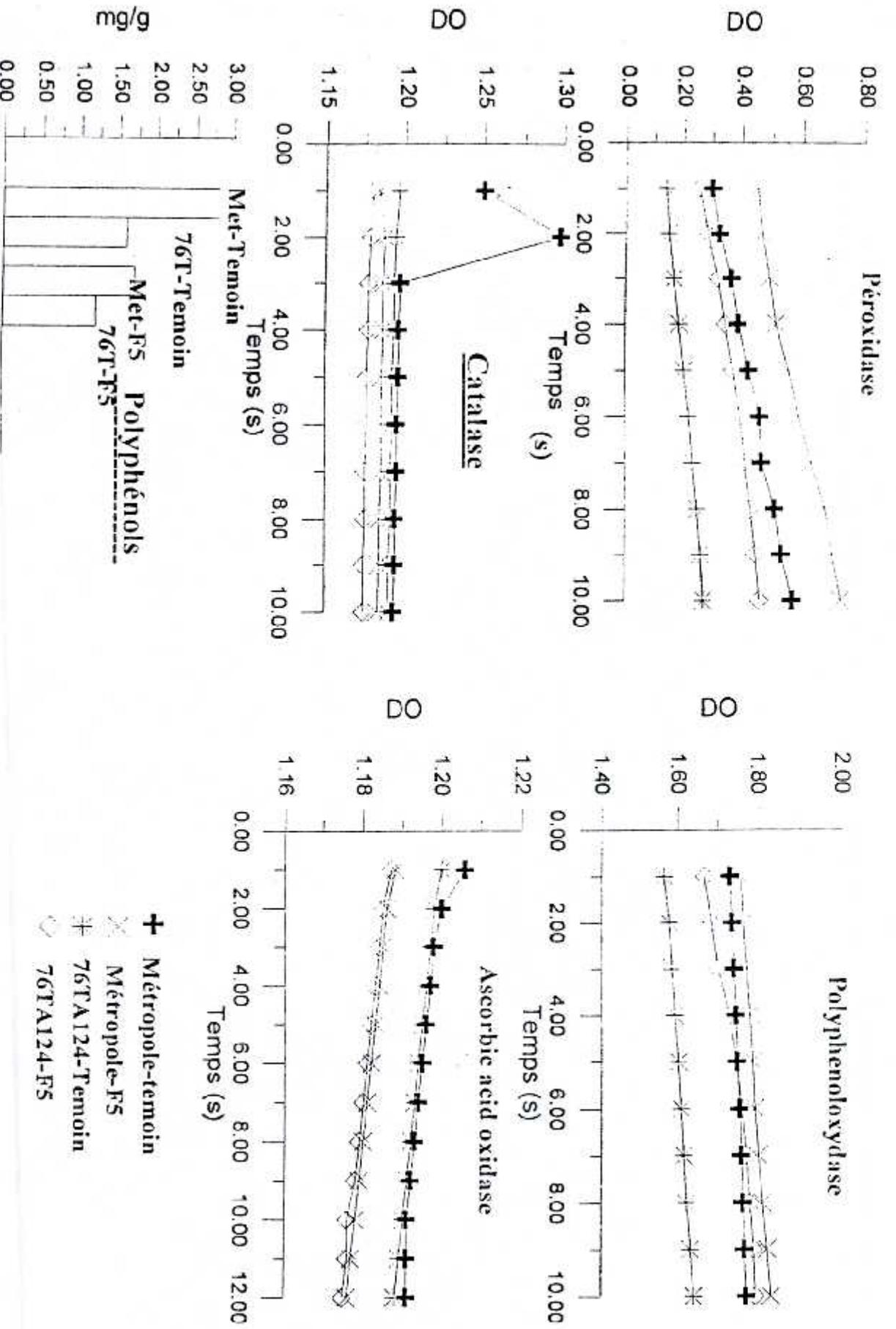


Figure 11: Taux de polyphénols et de quelques oxydases chez deux variétés de lentille

L'analyse de variance de la catalase, nous a permis de noter des différences significatives tant entre les isolats qu'entre les variétés et leur interaction (isolat-variété) (annexe 25). Ainsi le test de Newman-Keuls distingue trois groupes homogènes au niveau de l'interaction:

Premier groupe : comprend l'interaction Metropole-Temoin.

Deuxième groupe : comprend l'interaction 76TA124-Temoin.

Troisième groupe : comprend l'interaction Metropole-F5.

Quatrième groupe : comprend l'interaction 76TA124-Temoin.

En revanche, dans le cas de l'acide ascorbique oxydase, l'analyse de la variance n'a révélé aucune différence, que se soit entre les isolats qu'entre les variétés, ni même au niveau de leur interaction (annexe 26).

### 3.8.2- Discussion et conclusion:

Des résultats précédents, l'importance particulière est relevée dans le phénomène de résistance qui peut être jouer par les polyphénols d'une part et les deux oxydases d'autre part à savoir les polyphénols oxydases et les peroxydases.

En effet, les polyphénols se trouvent en quantité non négligeable dans la variété résistante comparativement à la variété sensible (fig 11). Nous avons pu remarqué également que cette quantité est beaucoup plus importante dans les plants inoculés que les plants sains.

Concernant les polyphénols, il est bien connu depuis longtemps que leur biosynthèse augmente dans les plantes après infection par des agents pathogènes (FARKAS et KIRALY, 1962; KOUSUGE, 1969; FRIEND, 1979). Ces mêmes auteurs, travaillant sur des variétés résistantes et sensibles de maïs vis à vis de l'agent pathogène *Helminthosporium carbonum*, ont remarqué que la quantité en polyphénols était deux à trois fois plus élevée dans les variétés résistantes que dans les variétés sensibles. Ces mêmes remarques ont été observées par SRIDHAR et OU (1974) travaillant sur la résistance des variétés de riz vis à vis de *Pyricularia oryzae*.

Généralement, les polyphénols sont des substances non spécifiques, et leur rôle réside dans l'inactivation ou l'inhibition de l'activité des protéines (BCMILLER et al, 1969). Les polyphénols, sont aussi considérés comme étant des substances qui jouent un rôle important dans l'inhibition des enzymes hydrolytiques, par une inhibition du développement microbien (BACKMAN et MULLER, 1970). D'autres

auteurs suggèrent que les polyphénols sont très actifs sous forme oxydée (les quinones), qui présentent une activité biologique très importante dans l'inactivation des enzymes fongiques et notamment pectinolytiques et cellulolytiques (RAYMOND, 1963; SURESH et al, 1967; BIEHN et al, 1968; KHALIFA et al, 1968).

Au même titre que les polyphénols, les peroxydases et les polyphénoloxydases sont plus importantes dans la variété résistante (Métropole) que la variété sensible (76TA124).

En effet, LOBSTEIN et LINSEY (1961), travaillant sur la peroxydase, ont montré que cette enzyme jouait un rôle physiologique important. Elle catalyse particulièrement les mono et diphenols et les amines aromatiques en quinones en présence de peroxyde d'hydrogène. Par conséquent, une activité de cette enzyme entraîne une augmentation du niveau de la résistance. C'est ainsi qu'une corrélation positive a souvent été montrée entre les activités peroxydasiques et la résistance (HAMMERSHMIDT et al, 1982; COULOMB et COULOMB, 1984; ABBATISTA et al, 1988).

D'autres travaux comme ceux de DEESE et STAHRMAN (1963) in BABAER et RAYMOND (1963), notent qu'une augmentation de la polyphénoloxydase, entraîne souvent une production accrue des quinones avec pour principal rôle, l'inhibition des enzymes pectinolytiques des agents fongiques.

L'existence de polyphénols dans ces tissus devrait aller de pair avec une forte activité peroxydasique et des polyphénoloxydases comme cela été établie par WARD,(1986) et BOUZNAD, (1989).

C'est pourquoi certains auteurs suggèrent que les PO et PPO jouent un rôle direct et déterminant dans les réactions de défense des plantes contre les agents pathogènes. (HAMMERSCHMIDT et al, 1982; LAZAROVITS et WARDS, 1982 ARORA et BAJAJ, 1983; CZECHOZLOWSKA et KRZYWANSKI, 1984).

D'ailleurs, il connu que l'activité peroxydasique est associée au phénomène de

Concernant la catalase et l'acide ascorbique oxydase, ces deux enzymes demeurent en quantité très faible dans toutes les combinaisons testées. Néanmoins, cette teneur est beaucoup plus faible dans les plants inoculés que les plants témoins bien que des corrélations positives aient été montrées entre l'activité de ces deux enzymes et l'augmentation de la résistance par plusieurs auteurs et notamment FRIC,(1976); SHERWOOD et VANCE, (1980) et WARD, (1986).

Cependant, en étudiant les oxydases, BAISHAN (1986), n' a détecté aucune activité spécifique de la catalase, par contre les activités de PO et PPO ont été retrouvées avec des quantités importantes.

En revanche, d'autre auteurs, suggèrent que les activités des PO et PPO ainsi que de la catalase peuvent être détectées simultanément, alors que dans d'autres cas une seule enzyme peut être impliquée. Ce comportement peut expliquer en partie la faible présence de la catalase et de l'acide ascorbique oxydase dans notre cas.

## CONCLUSION GENERALE

Les maladies fongiques constituent un problème phytosanitaire le plus crucial des légumes secs en Algérie et constituent un facteur limitant aussi bien pour la production des semences que pour la production destinée à la consommation.

En effet, l'Algérie accorde ces dernières années une priorité à ces cultures. Cependant avec l'extension des superficies cultivées, les risques d'apparition de nouvelles maladies augmentent sans cesse. C'est ce qui a justifié en partie le choix du sujet.

L'analyse sanitaire des semences, nous a permis de mettre en évidence la présence de *Fusarium solani* et à moindre degré le *F. oxysporum* sur les différentes variétés mais surtout sur les variétés locales par rapport à celles introduites.

En traitant le problème du complexe de flétrissement et de pourriture racinaire, nous avons mis en évidence dans un premier temps la présence du *F. solani* agent de la pourriture racinaire dans les deux régions prospectées. par contre la présence de *Fusarium oxysporum f.sp. lentis* se trouve limitée uniquement à deux parcelles seulement à savoir celle se trouvant dans la région de Dahmouni (Tiaret). et dans la région de Sabiine (Tissemsilt).

Ces deux espèces constituent un groupe d'agents pathogènes qui entraînent des symptômes comparables sur les parties aériennes et par conséquent il est très difficile de les différencier.

D'autre part, l'étude de la transmission des agents pathogènes et particulièrement du genre *Fusarium*, a révélé que la technique d'Agar test constitue le moyen le plus efficace pour la mise en évidence de la mycoflore fongique en général et particulièrement les *Fusarium spp.*, en vue de l'exigence de ce genre sur le plan nutritionnel et environnemental.

Le test de pathogénicité étudié ayant porté sur les huit isolats de *Fusarium solani* et trois isolats de *F. oxysporum*, nous ont permis de vérifier l'agressivité et par la même occasion mesurer le pouvoir pathogène de ces isolats. Seuls quatre isolats de *F. solani* et un isolat de *F.o.l.*, ont été maintenus dans les études ultérieures. Pour

ce choix, on a tenu compte à la fois de l'origine géographique de l'isolat et surtout de son agressivité (pouvoir pathogène).

La spécificité parasitaire a été évaluée pour les quatre isolats de *F. solani* et un isolat de *F.o.l.* Les premiers ont montré une certaine polyphagie vis à vis des espèces de légumineuses testées, ce qui nous a permis d'identifier cette espèce comme étant la forme spéciale *Fusarium solani F.sp. pisi*. Par contre l'isolat du *F.o.l.*, a montré une haute spécificité vis à vis de leur hôte d'origine à savoir la lentille. Cependant, il peut parasiter les autres espèces testées sans pouvoir provoquer des symptômes visibles. Ceci révèle une fois de plus l'inefficacité de certains travaux agricoles, telle la rotation, comme moyen de lutte contre ces agents pathogènes.

Dans une deuxième partie, la caractérisation morphologique et culturale a montré une hétérogénéité très marquée de la dimension et à moindre degré la forme des spores entre le *F. solani* et le *F.o.l.* Par ailleurs des différences demeurent au sein même de l'espèce, c'est à dire entre les isolats eux mêmes.

La caractérisation culturale, d'autre part, constitue aussi un moyen efficace pour différencier le *F. solani* et le *F.o.l.*

Par la suite, les exigences biologiques (abiotiques et biotiques) ont été approfondies. C'est ainsi que l'étude *in vitro* portant sur le comportement des différents isolats de *F. solani* a permis de préciser le rôle important que peut jouer certains facteurs abiotiques tels que la température, l'humidité, le pH, la lumière. Ainsi nous avons pu déterminer les conditions optimales de croissance et de sporulation pour chaque facteur.

Le facteur nutritionnel, lui aussi semble jouer un rôle primordial pour la croissance et la sporulation. Nous avons constaté par ailleurs, que le milieu le plus favorable aussi bien pour la croissance que pour la sporulation est le milieu PDA, qui est un milieu à base de décoction de pomme de terre qui est à la fois riche en sucres complexes (amidon) et simple (glucose) et en éléments nutritifs (acides aminés, vitamines et sels minéraux).

Par ailleurs, la réaction variétale d'une dizaine de variétés locales et introduites a été testée pour la résistance vis à vis des deux agents. Au cours de ce test, nous avons pu noter la présence d'une différence dans la sensibilité de ces variétés. Ainsi

la variété Métropole s'est montrée la moins sensible alors que la variété 76TA124 s'est montrée la plus sensible à tous les isolats de *F. solani*. Cette même variété s'est montrée aussi la plus sensible vis à vis de *F.o.l.*

Concernant l'agressivité des quatre isolats de *F. solani*, l'isolat F5 s'est montré le plus agressif alors que l'isolat F3 s'est montré le moins agressif; l'isolat FT et F1 ont montré une agressivité intermédiaire.

Grâce à la réaction de ces cultivars, nous avons pu entamer une étude biochimique de la résistance en évaluant la présence de certaines enzymes telles que les peroxydases, les polyphénoloxydases, acides ascorbiques oxydases et d'autres substances antifongiques comme les polyphénols.

Ainsi, nous avons pu montrer que les peroxydases, les polyphénols et les polyphénoloxydases sont des substances qui se trouvent en quantité importante dans la variété résistante par rapport à la variété sensible. Par contre l'acide ascorbique-oxydase, elle semble n'avoir aucun rôle précis dans le phénomène de résistance.

La tentative d'approche électrophorétique pour caractériser les différents isolats de *F. solani* et le *F.o.l.*, nous a permis de différencier entre les deux espèces de *Fusarium*, par simple observation de leur zymogramme grâce aux nombres de bandes électrophorétiques rencontré au niveau des deux systèmes enzymatiques étudiées à savoir les estérases et les malates déhydrogénases. Cependant, cette différence est très difficile à détecter entre les isolats de *F. solani* et particulièrement, si on veut étudier un rapprochement entre agressivité de ces isolats et les caractéristiques de leurs zymogrammes.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**ALAVAREZ A.M., et BRINER D.C., 1987** - Pudricion radicular del garbanon por el hongo *Fusarium solani* (Mart )sacc. Agricultura tecnica. 47(1):78-79.

**ALAVAREZ M. A., et MORENO A.P., 1984** - Identification de hongos causantes de pudricion radicular ongarganso. Agricultura tecnica. 4:252-258.

**AMEZIANE E. A.H., 1979** - Quelques aspects de la biologie d'*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. DEA. Agronomie, ENSA. Montpellier, 28p.

**ANONYME, 1978** - Studies on *Fusarium* wilt of chickpea by ICRISAT. Pulse pathology. Report of work. June 77-May 78. pp: 2-23

**ANONYME (a), 1982** - La conduite traditionnelle et améliorée de la culture de la lentille et du pois chiche. Céréaliculture, 14, pp: 8-18.

**ANONYME (b), 1982** - Cahiers techniques de l'agriculture. I.T.G.C., pp: 3-47

**ANONYME, 1986** - Caractéristiques, exigences et potentiel de production des différents variétés de légumes secs en Algérie. Algérie verte. 5. pp: 15-21.

**ANONYME 1987** - La lentille et le pois chiche pour une conduite mécanisée. I.T.G.C., 30p

**ANONYME, 1988** - Caractéristiques, exigences et potentiel de production des différentes variétés de légumes secs. I.T.G.C. Alger, Algérie verte n°5, pp: 12-25.

**ANONYME (b), 1982** - Cahiers techniques de l'agriculture. I.T.G.C., pp: 3-47

**ANONYME , 1995** - Cahiers techniques de l'agriculture. I.T.G.C., pp: 10-20.

**ANTHELME B; BENALI S, et ORDACHE C., 1978** - Contribution à l'étude de de protéines des légumes secs cultivé en Algérie. Ann. Inst. Nat. Agro. EL HARRACH, VIII(1), pp: 63-74

**ARORA Y.K., et BAJAJ K.L,1986** - Peroxydase and polyphénoloxydase associated with induced resistance of soybean to *Rhizoctonia solani* Kuhn. Phyto Z. Vol 112: 322-332.

**BACKMANN C.M., et MULLER W.C., 1970** - Distribution of phenols in specialized cells of banana cells. Phytopathology, 60(1) : 79 - 82.

**BARNETT H.L., et HUNTER B.B., 1972** - Illustrated genera of imperfecti fungi. Burges publishing campagny, Minneapolis, 241p.

- BAYA'A H.R., ERSKINE W., et KHOURY L., 1986** - Survey of wilt damage on lentil in northwest Syria. Arab.J. Pl.Prot. 4:118-119.
- BAYAA B., et ERSKINE W., 1990**- A screening technique for resistance to particular wilt in lentil. Arab J. Plant Protection, 8:14-22.
- BEMILLER J.N., TEGTMEIER D.O., et PAPPELIS A.J., 1969**: Effect of polyphénols and indolacetic acid on production and activity of cellulolytic and pectolytic enzyme of *Diplodia zaeae*. Phytopathology .59(5):674-676.
- BENIWAL S.P.S., BAYA'A B., KHARE M.N., 1991** - Selection methods for disease resistance in lentil; International center for agricultural research, Aleppo, Syria, 19p.
- BHATTI M.A., et KRAFT J.M., 1992**- Influence of soil moisture on root rot and wilt of chickpea . Plant .Dis .76:1259-1262
- BIEHN W.L., KUC J, et WILLIAMS E.B., 1968** - Accumulation of phenols in resistant plant fungi interactions. Phytopathology 58(9): 1255 - 1260.
- BODJDOVA J., et SINSKY T., 1990** - Species spectrum of the *Fusarium* genus on lentil in Czechoslovakia. Lens Newsletter, 17(12). 29 - 31.
- BOMPEIX G., 1974** - Action de la lumière et de la température sur le comportement du *Pezizula alba* et *Pezizula malicorticus*. Ann. Phytopathol. 6(1): 13- 24.
- BONDE H.R., PETERSON G.L., et DOWLER W.M., 1988** - A comparaison of isoenzymes of *Phakospora* from the pachyrhizi from the eastern hemisphere and the new world. Phytopathology ,78 : 1491 - 1494.
- BOORSMA P.A., 1978** - Chickpea breeding IPHR Morocco .MARA, DRA. Station centrale des légumineuses alimentaires. Rabat. 35p.
- BOOTH C., 1971** - The genus *Fusarium*. Comm.Mycol. Inst. Kew. Survey England. 237p.
- BOOTH C., 1977** - *Fusarium* laboratory guide of the identification of the major species. C.M.F.New survey. England. 58p.
- BOUCHET P.H., 1979** - Abrégé de cryptogamie. Ed .Masson, Paris, 207p.
- BOUZNAD Z., 1989** - Contribution à la connaissance du genre *Ascochyta* chez les légumineuses en Algérie. Etude biologique, ultrastructurale et cytochimique des relations hôte-pathogène chez le couple *A.pisi Pisum sativum*. Thèse. Doc. es. Sci. Nat. Univer. Pierre Marie Curie, 190p.
- BREWER D., 1960** - Studies of *Ascochyta pisi* .Lib.Can.J.Bot,38:705-717.

- EL AHMED M., MOUSSELLI L., 1987** - Wilt and root rot of lentil (*Lens esculenta*) *Lens* newsletter, 14(112): 10 - 14.
- ERSKINE W., BAYA'A B., et DOHLI M., 1990** - Effect of temperature and some media and biotic factors on the *Fusarium oxysporum f.sp.lentis* and its mode of seed transmission. *Arab. J. Pl. Prot.* 8 :34 - 37.
- ERWIN D.C., 1958** - *Fusarium lateritium f.sp.ciceri*. incitant of *Fusarium* wilt of *Cicer arietinum* . *Phytopathology*, 48: 498 - 501.
- GREWAL J.S., PAL M., et KULSHRESTHA D.D., 1974** - Fungi associated with gram wilt. *Indian. J. Genet and plant breeding*, 34: 242 - 246.
- GUPTA O.M. et KOTASTHANE S.R., 1978** - Efficacy of fungicidal seed treatment on pre and post emergence mortality in different varieties of Bengal gram. *International chickpea newsletter* 6:32 (Abstr).
- HAMES B.D. et RICKWOOD D., 1987** - Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. IRL Press. Oxford, England, 7th edition, 290p
- HAMMERSMIDT R., et KUC J., 1982** - Lignification for induced systemic resistance in cucumber. *Physiol. Plant pathol.* 20: 61 - 71.
- HANOUNIK S.B., 1979** - Disease of major food legumes crops in Syria. Pages 98-102 in proceedings of a workshop on food legumes improvement and development held at the university of Aleppo. ICARDA, 2-7 May 1978, Aleppo, Syria
- HARRISON D.J., THOMSON A.J., CHU .D., PEET F.C., et SAHOTA T.S., 1989** - Variation in isozymes patterns of estérases and polyphénoloxydases among isolates of *Armillaria ostya* from British Columbia . *Can. J.Plant. Pathol.* 11:229-234.
- HAWARE M.P., 1988** - *Fusarium* wilt and other important diseases of chickpea in the mediterranean area . Proceeding of the international workshop on the present status and the future prospects of chickpea crop production and improvement in the mediteranean countries. CIHEAM/EEC. AGRIMED / ICARDA, 11-13 July 1988. Zaragoza, Spain.
- HAWARE M.P., NENE Y.L. et MATHUR S.B., 1986** - Seed borne disease of chickpea. Technical bultein n°1 from the Danish government institute of seed pathology for the developing countries. Copenhagen. Danemark. 16p
- HAWARE M.P., NENE Y.L., 1982** - Races of *Fusarium oxysporum f.sp.ciccr.* *Plant disease.* 66: 809 - 810. HAWTIN. Commonwealth Agricultural Bureau. Farnham. U.K. 163-172.
- JIMENEZ-DIAZ R.M., et TRAPERO-CASAS A., COLINA J., 1989** - Races of *Fusarium oxysporum f.sp.ciceri* infected chickpea in southern Spain. *Basculat wilt diseases of plants. Nato. Asi. series. vol.428:515-520.*

- KRAFT J.M., et ROBERTS D.D.,1969-** Influence of soil water and temperature on the pea root rot complex *Pythium ultimum* and *Fusarium solani. f.sp pisi*. *Phytopathology* 59:149-152.
- KUC J.,1969-**Biochemical control of diseases resistance in plants .*World Rev.Pest control*,7:42-55.
- KUMAR J., HAWARE M.P., 1983 -** *Fusarium* wilt resistant kabuli strains developed by I.C.R.I.S.A.T.*International chickpea Newsletter*,8:7-8.
- LABDI M.,1990-**Contribution à l'étude de la variabilité d'isolats d'*Ascochyta rabiei*, agent de l'antrachnose du pois chiche en Algérie .D.E.A.-ENSA.Montpellier,36p.
- LAMAMERI R., 1992 -** Les légumineuses dans l'alimentation humaines. *EL-ARDH*, 20: 32 - 37.
- LAUMONT P, et CHEVAUSSUS A, 1986 -** Notes sur l'amélioration de la lentille en Algérie. *Ann. INA. El Harrach*. 2: 3 - 4.
- LAUMONT P.S., et CHEVASSUS A., 1960 -** L'amélioration de la lentille en Algérie. *A.E.N.A.A.*, Tom, Fasc3, 67p.
- LEACH C.M.,1962-**The quantitative and qualitative relationship of UV and visible radiations to the induction of reproduction in *Ascochyta pisi*.*Lib .Can.J.Bot* 40:1577-1602.
- LINDE D.C.,GROTH J.V., et ROELFS A.P,1990-**Comparaison of isozyme and virulence diversity patterns in the bean rust fungus: *Uromyces appendiculatus* .*Phytopathology* 80:141-147.
- LINEE J.M., et BURDON J.J.,1999-**Preliminary study of virulence and isozymic variation in natural populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *S.gnianensis*. *Phytopathology* 80:728-731.
- LOVREKOVICH L.,LOVREKOVICH H.,et STAHMANN M.A.,1968 -** :The importance of peroxydase in the wildfire diseases.*Phytopatholgy* 58:2:193-198.
- MANI A, et SETHI C.L.,1984 -** Reaction of certain chickpea to root knots nematode, *Melodogyne incognita*. *International chickpea Newsletter* .10:15-16.
- MARRISON D.J., et BATMEMAN D.F.,1967 -** Changes in the activities of some oxydases in extracts of *Rhizoctonia* infected bean hypocotyls in relation to lesions maturation .*Phytopathology* 57:132-136.
- MESSIAEN C.M., et CASSINI R.,1968-**Recherches sur les fusarioses .JV La systématique des *Fusarium*. *Ann.Epiphyties* 19(3):387-454.
- MEYER D.T., et RENARD J.L.,1969-**Protein and estérase patterns of two formae speciales of *Fusarium oxysporum*.*Phytopathology* 59(10):1409-1411.

- JULIAN A.M., et LUCAS J.A., 1990** - Isozyme polymorphism in pathotypes of *Pseudocercospora herpotrichoides* and related species from cereals. Plant pathology, 39: 178 - 190.
- KAISER W.J., 1972** - Occurrence of three fungal diseases of chickpea in Iran. FAO plant Prot Bull., 20: 74 - 78.
- KAISER W.J., HANNAN R.M., 1986**-*Ascochyta* of seed borne *Ascochyta lentis* in germ plasm. Phytopathology 76: 355-360.
- KANNIAYAN J, NENE V.L, 1972** - Sclerotial blight of lentil. Current Sci. 42: 32-35.
- KHALIFA A., OKASHIA K.R., STEPHEN W. et BRINGHURST R.S., 1968** - Inhibition of the growth of the *verticilium alboatrum* spoiling by tannins and polyphénols from infected crowns of *Verticilium* resistant and susceptible strawberry cultivars. Phytopathology, 58(8): 1114 - 1117.
- KHARE M.M., 1980** - Wilt of lentil ...JNKVV, Jabalpur, India, 155p.
- KHARE A.M., 1981** - Diseases of lentils .in "Lentils "Eds.C.WEBB KHARE M., AGRAWAL O., ET JOSHI L.K., 1985-Studies on diseases of lentil. Page 6 in proceedings of XIV Annual of workshop on Rabi pulses. Indian council of agricultural research, New Delhi, India.
- KHARE M.N., AGRAWAL S.C., DHINGRA O.D., KUSHWAHA L.S., 1975** - Variability in the growth of eight strains of *Fusarium oxysporum f.sp.lentis* on different solid media Indian phytopathology, 28:126-128.
- KHERBANDA P.D., et BREWER C.C., 1980** - Cultural and pathogenic variability among isolates of *Ascochyta fabae*. Can. J.Pl. pathol. 2: 139 - 142.
- KOCH P.D., et KOHLER W., 1990** - Isozymes variation and genetic distances of *Erysiphe graminis* D.C. Phytopathology 119: 89-101.
- KOSUGE T., 1969** - The role of phenolics in the host response to the infection Ann. Rev. Phytopathol. 7: 195 - 219.
- KOTISTHANE S.R., et AGRAWAL S.C., 1978** - Chemical control of preemergence mortality in Bengal gram. Pesticides. 12: 34 - 35.
- KRAFT J.M, 1969** - Chickpea, a new host of *Fusarium solani f.sp.pisi*. Plant. Dis. Repr. 53: 110 - 111.
- KRAFT J.M., 1978**- Effects of root rot pathogens on *Fusarium* wilt of peas. Plant.Dis reptr 62:216-221.

- MOLOT P.M., CORNUS M., FERRIERE H., et LOMBARD D.,1990** - Evolution de la fusariose de l'asperge en conditions hivernales .Influence du froid sur la réceptivité de la plante. Utilisation des greffes ."Frigo".Rev Hort.n°303:33-36.
- MOLOT P.M., et MAS P.,1975**-Influence de la température sur la croissance mycélienne et sur le pouvoir pathogène de quatre races physiologiques de *Fusarium oxysporum f.sp.melonis* . Ann. Phytopathology. 7(2):115-121.
- MOREAU F.,1953**-Les champignons .Ed .Paul Lechevalier, Paris.110p.
- NELSON K.H., et GARBER E.D.,1967**-An electrophoretic survey of estérases,+phosphatases and leucine aminopeptidases in mycelial extracts of species of *Aspergillus* .Mycologia 59:330-336.
- NENE Y.L.,HAWARE M.P., et REDDY M.V.,1978** - Diagnosis of some wilt like disorders of chickpea (*Cicer arietinum* ) .Information Bull n°3,India, ICRISAT,44p.
- NENE Y.L. et REDDY M.V.,1987** - Chickpea diseases and their control .In: SAXENA M.C.,et SINGH K.B. (eds). the chickpea -CAB International, Wallingford :233-270.
- NYVALL R.F., et HAGLUND W.A.,1972**- Sites of infection of *Fusarium oxysporum f.sp.pisi*, race 5 on peas .Phytopathology 62:1419-1424.
- OMAR S.A.M., SALEM D.E., et RIZK M.A.,1988** - Sources of resistances to root rot /wilt disease complex of lentil. Lens Newsletter 15(1):37-39.
- OTROSINA W.J. et COBB E.W.,1987** - Analysis of alloenzymes of three distinct variants of *Verticillium dactylophorum* from conifers in western north America.Phytopathology 77:1360-1363.
- RAJENDRA .P, et CHANDHARY K.C.B., 1987** - Seed borne mycoflora .Lens Newsletter 14(2):20-21.
- RAPPILLY F.,1969** - Techniques de mycologie en pathologie végétales .Ann Epiphyties. 102p.
- RAYMOND E.H.,1962** - Activity of some soluble oxydases in carrot slices infected with *Thielaviopsis basicola*. Phytopathology 53(5):497-498.
- REDDY M.N.,et STAHRMAN M.N.,1972** - Isozyme patterns of *Fusarium* species and their significance in taxonomy.Phytopath.Z.74:115-125.
- RIDE J.P.,1975** - Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance . Physiol plant pathol .5:125-134
- ROUBAH M.,1989**-Contribution à l'étude du flétrissement du pois chiche (*Cicer arietinum*) en Algérie . Thèse. Ing. INA. El Harrach. Alger. 65p.

- SAXENA D.R., et KHARE M.N.,1988** - Factors influencing vascular wilt of lentil.Indian phytopathology. 41(1):69-74.
- SHARMA M.C., DESHKAR M.V., et KHARE M.N.1978** - Factors affecting *Fusarium* wilt of lentil (*Lens esculenta*) In phytopathological wilting plants .Madras,University of Madras.pp:277-289.
- SHARMA T.P., et SHARMA K.D.,1978** - Studies on moisture content, mycoflora and germination of lentil (*Lens esculenta* ) seeds. Seed research.6:31-37.
- SHETTY. M.S., 1988-** Different types of damages in seeds caused by seedborne fungi,1988. Proceedings of the international workshop on seed pathology, sponsored jointly by ACTA and Danish. government institute of seed pathology, 20-25, june 1988,Copenhagen, Danemark, 53-62.
- SHUKLA P, SINGH R.R., et MISHRA A.N., 1981** - Search for best dressing fungicides to control chickpea wilt (*Fusarium oxysporum*). Pesticides 15:15-16.
- SICILIANO M.J., et SHAW C.R., 1976** - Separation and visualisation of enzymes on gels .In :Chromatographic and electrophoretic techniques. Vol II.Ed I SMITH, London, UK WILLIAM Heinemann Medical books. LTD:185-209.
- SIHASSEN A., 1990** - Contribution à l'étude du flétrissement du pois chiche causée par le *Fusarium oxysporum.f.sp.ciceris* .Caractérisation pathologique et résistance variétale. Thèse. Ing. Agro. INA El- Harrach, 95p.
- SIMCOX K.D., NICKERT D., et PETERSON W.L., 1992-** Comparaison of isozyme polymorphism in races of *Cochiobolus carbonum*. Phytopathology 82:621-624.
- SMITHSON T.B., THOMPSON T.A., et SUMMERFIELD R.J., 1985** - Chickpea (*Cicer arietinum* L).Grasin legume crops:350-356.
- SOLMEN M.E., 1951** - Control of humidity with potassium hydroxyde sulfuric acid and others solutions .Bull Res.,42:543-554.
- SURESH S.P.,DIAMOND A.E., 1967** - Inhibition of *Verticillium* polygalacturonase by oxidation products of polyphénols .Phytopathology 57(5):492-496.
- TRAPERO-CASAS A., et JIMENEZ -DIAZ R.M., 1981** - Occurence and ethiology of chickpea "wilt complex" insouthern Spain .Chickpea Newsletter5:10-11.
- TRAPERO-CASAS A., 1983** - La marchitez y podredumbre de raiz del garbenzo en valle del Guadalquivir:Importancia, distribucion, ethiologia, epidemiologia y medios de lucha. Chickpea Newsletter 7: 20-22.

- TRAPERO-CASAS A., et JIMENEZ -DIAZ R.M., 1985 a** - Etiologia ,importancia y distribución de la seca del garbenzo en el valle del Guadalquivir .Ed Pasco y Infancia Isubel Madrid ,49p.
- TRAPERO-CASAS A., et JIMENEZ -DIAZ R.M., 1985 b** - Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in couthern Spain. *Phytopathology* 75:1146-1151.
- VAN DER PLANK J.C., 1968** - Disease resistance in plants. Academic press, New york. London: 206p.
- VAN RHEENEN H.A., REDDY M.V.,KUMAR J., et HAWARE M.P., 1989** - Breeding for resistance to soil borne diseases in chickpea.Consultancy ,meeting on breeding for disease resistance in Kabuli chickpea. March 6-8, 1989, ICARDA, Aleppo, Syria .
- VISHUNAVAT K., et SHUKLA P.,1979** - Fungi associated with lentil seeds. *Indian phytopathology*. 32:279-280.
- WALKER J.C.,1952** - Disease of vegetable crops .Mc Graw Hill books company Inc,New york.
- WALKER J.C.,1965** - Use of environmental factors in screening disease resistance .*Ann.Rev.Phytopathology* 3.197-208.
- WALKER J.W., 1961** - Plant pathology ,3<sup>ème</sup> Ed.829p
- WILSON V.E., et BRANDSBERG J., 1965** -Fungi associated from diseased lentil seedling in 1963-1964. *Plant Dis .Reptr.*49:660-662.
- WUSTERLUND F.V.,CAMPELL R.N.J., et KIMBLES K.A., 1974** - Fungal root rots and wilt of chickpea in California. *Phytopathology* 64:432-436.
- YI SHANG L. et JAMES COOK R.,1977** - Root rot of lentil caused by *Fusarium roseum* 'Avanaceum'. *Plant. Dis. Repr.* 61(9):752-755.

**ANNEXE 1: Composition des différents milieux de culture****Milieu de culture à base de pomme de terre**

-Pomme de terre	200g
-Glucose	20g
-Gélose	20g
-Eau distillée	1000ml

Autoclaver 30 minutes à 104°C

**Milieu de culture à base de lentille**

-Farine de lentille	70g
-Glucose	20g
-Gélose	20g
-Eau distillée	1000ml

Autoclaver 30 minutes à 104°C

**Milieu RICHARDS :**

-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
-MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5g
-FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.005g
-ZnSO <sub>4</sub>	0.005g
-MnCl <sub>2</sub>	0.002g
-Galactose	20g
-Glycocolle	2.250g
-Eau distillée	1000ml

Autoclaver 30 minutes à 104°C

**Milieu CZAPECK**

-NaNO <sub>3</sub>	2G
-K <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub>	1g
-KCl	0.5g
-MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5g
-FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01g
-Saccharose	30g
-Gélose	15g
-Eau distillée	1000ml

Autoclaver 30 minutes à 104°C

**ANNEXE 2 : Tampon d'échantillons**

Solution marqueur d'échantillon PAGE

Glycérol	5ml
Bleu de bromophénol à 1%	1ml
Eau distillée	10ml

Conserver au congélateur

**ANNEXE 3 : Solutions mères pour électrophorèse****Acrylamide -bisacrylamide**

Acrylamide	30g
Bisacrylamide	0.8g
Eau distillée	100ml

Filtrer et conserver à 4°C à l'abri de la lumière

**Tampon pour gel de séparation ( Tris -HCl 1.5,- pH 8)**

Tris	36.6g
Eau distillée	100ml
Ajuster le pH à 8.8 avec HCl 1M	24ml
Eau distillée	200ml

Filtrer et conserver à 4°C

**Tampon pour gel de concentration (Tris -HCl 0.5M-pH 6.8).**

Tris	3g
Eau distillée	20ml
Ajuster le pH à 6.8 avec HCl 1M.	24ml
Eau distillée	50ml

**Solution de persulfate d'ammonium à 10 p.cent**

Persulfate	50mg
Eau distillée	0.5ml

**Tampon de migration (Tris 0.25M-glycerine 1.92M-pH 8.3)**

Solution concentrée 10 fois	
Tris	30.3g
Glycérine	144g
Eau distillée	1000ml

Conserver à 4°C

**ANNEXE 4 : Préparation des gels**

Solutions mères	Gel de concentration 4% acry	Gel de séparation 7% acry
Acrylamide -bisacrylamide	1.34 ml	5ml
Tampon pour gel de concentration	2.5ml	-
Tampon pour gel de séparation	-	5ml
Eau distillée	6.1ml	9.9ml
Dégazer la solution jusqu'à la disparition complète des bulles d'air		
Persulfate à 10 p cent	67µl	100µl
TEMED	7µl	10µl

Les volumes sont calculés pour les quatre gels de la minicuve Hoefer

**ANNEXE 5 : Révélation des estérases**

Tampon phosphate 0.1 , pH 6.0

**Solution A**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15.6g
Eau distillée	1000ml

Ajuster à pH 6 avec NaOH 1M

**Solution B**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	53.65g
Eau distillée	1000ml

Ajuster à pH6 avec HCl 1M

**Solution de colorant**

Tampon phosphate	25ml	22ml de A +3 ml de B
Fast bleue RR salt		25mg

Dissoudre le colorant à l'obscurité, puis filtrer la solution .

**Solution des substrats**

Acétone	0.5ml
Alpha naphthyl acetate	0.5ml
Alpha naphthyl propionate	100mg

**Mode opératoire:**

Le gel est immergé, après l'électrophorèse, dans la solution de colorant additionnée de la solution de substrat. Le gel est mis à incuber 37°C, à l'obscurité pendant 20 à 30 mn. Les bandes d'activité apparaissent en rose ou brun. Le gel est conservé et séché à l'air entre deux feuilles de Cellophane préalablement imbibées de solution de conservation.

## ANNEXE 6 :

## a)- Révélation des malates déhydrogénases

## Tampon tris( HCl 0.2M-pH 8.0)

Tris	2.42g
Eau distillée	100ml

Ajuster à pH8 avec HCl 5N

## Solution de révélation (à l'obscurité).

Tampon Tris-HCl	5ml
Eau distillée	17.5ml
P.M.S	1mg
N.B.T	7.5mg
N.A.D	12.5mg
L. malate de sodium	100mg

A dissoudre dans 2.5 ml d' eau.

**Mode opératoire:**

Le gel est immergé après électrophorèse dans la solution de révélation et mis à incuber 37°C à l'obscurité pendant 30mn.

Les bandes d'activité apparaissent en bleu. Le gel est conservé puis séché entre deux feuilles de Cellophane préalablement imbibées de solution de conservation.

## b)- Réactifs chimiques pour le dosage des enzymes oxydases:

## Réactifs pour la détermination de la peroxydase:

- 0.5 ml de phosphate de sodium 1M, pH =7
- 0.3ml de l' extrait enzymatique
- 0.3ml de pyrogallol 0.001M
- 1.2 ml d H<sub>2</sub>O distillée
- 0.7ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## Réactifs pour la détermination de la catalase:

- 0.6 ml de phosphate de sodium 0.2M, pH=7.6
- 0.4 ml de l' extrait enzymatique

- 0.3 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 2.8 ml de H<sub>2</sub>O distillée

**Réactifs pour la détermination de la polyphénoloxydase:**

- 1 ml de l' extrait enzymatique
- 1ml de phosphate de sodium 0.2M, pH =7
- 1 ml de catécol 0.001M
- 3 ml de H<sub>2</sub>O distillée

**Réactifs de Follin Dennis:**

- 100g de tungstate de sodium
- 20g de l'acide phosphomolybdique
- 50g de l'acide phosphorique

**Solution saturée de carbonate de sodium:**

- 350 g de carbonate de sodium
- 800 ml d'eau chaude

**Solution d'acide tannique:**

- 100 g d'acide tannique
- 100 ml d'eau distillée

**Préparation de la gamme étalon:**

A partir d' une solution mère, on prélève 05, 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10ml qui seront complétées à 100 ml d'eau distillée pour avoir les concentrations de 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 mg/ml respectivement.

**ANNEXE 7: Analyse de la variance de l'influence de l'humidité sur la croissance mycélienne de quatre isolats de *F. solani***

	DLL	CM	test F	Proba
Var totale	83	1.91		
Var facteur 1	3	1.62	22.06	0.0000
Var facteur 2	6	23.93	324.81	0.0000
Var inter 1.2	18	0.33	4.46	0.0400
var résiduelle	56	0.07		

**ANNEXE 8: Analyse de la variance sur l'influence du pH sur la croissance mycélienne de quatre isolats de *F. solani***

	DLL	CM	test F	Proba
Var totale	83	0.57		
Var facteur 1	3	0.99	19.47	0.0000
Var facteur 2	6	6.64	130.71	0.0000
Var inter 1.2	18	0.10	1.87	0.0382
var résiduelle	56	0.05		

**ANNEXE 9: Analyse de variance sur l'influence de la température sur la croissance mycélienne de quatre isolats de *F. solani***

	DLL	CM	test F	Proba
Var totale	83	6.43		
Var facteur 1	3	1.93	67.13	0.0000
Var facteur 2	6	86.01	2997.67	0.0000
Var inter 1.2	18	0.57	19.92	0.0450
var résiduelle	56	0.03		

**ANNEXE 10: Analyse de la variance sur l'influence de milieux de cultures sur la croissance mycélienne de quatre isolats de *F. solani***

	DLL	CM	test F	Proba
Var totale	83	0.62		
Var facteur 1	3	0.89	14.36	0.0000
Var facteur 2	6	6.56	105.76	0.0000
Var inter 1.2	18	0.43	6.85	0.0420
var résiduelle	56	0.06		

**ANNEXE 11: Analyse de la variance de l'influence du pH sur la sporulation de quatre isolats de *F. solani***

	DLL	C.M	test F	Proba
Var totale	83	12.44		
Var facteur 1	3	21.92		0.0000
Var facteur 2	6	128.28	375.69	0.0000
Var inter 1.2	18	10.77	2199.13	0.0382
var résiduelle	56	0.06	134.58	

**ANNEXE 12: Analyse de la variance de l'influence de la température sur la sporulation de quatre isolats de *F. solani***

	DLL	CM	test F	Proba
Var totale	83	17.47		
Var facteur 1	3	4.80		0.0000
Var facteur 2	6	233.47	35.35	0.0000
Var inter 1.2	18	1.53	1718.77	0.0520
var résiduelle	56	0.14	11.25	

**ANNEXE 13: Analyse de la variance de l'influence des milieux de cultures sur la sporulation de quatre isolats de *F. solani***

	DLL	CM	test F	Proba
Var totale	83			
Var facteur 1	3			0.0000
Var facteur 2	6			0.0000
Var inter 1.2	18			0.0344
var résiduelle	56			

**ANNEXE 14: Analyse de la variance sur l'influence de l'humidité sur la sporulation de quatre isolats de *F. solani***

	DLL	CM	test F	Proba
Var totale	83	14.52		
Var facteur 1	3	16.43	191.38	0.0000
Var facteur 2	6	178.65	2081.41	0.0000
Var inter 1.2	18	4.38	50.99	0.0120
var résiduelle	56	0.09		

**ANNEXE 15: Analyse de la variance des diamètres des microconidies de quatre isolats de *F. solani***

	DLL	CM	test F	CV
Var totale	49	0.28		
Var facteur 1	4	2.61	38.58	
Var Bloc	9	0.11	1.67	
Var résiduelle 1.	36	0.07		8.9%

**ANNEXE 16: Analyse de la variance des diamètres des macroconidies de quatre isolats de *F. solani***

	DLL	CM	test F	CV
Var totale	49	0.10		
Var facteur 1	4	0.12	1.87	
Var Bloc	9	0.26	4.18	
Var résiduelle 1.	36	0.06		8.9%

**ANNEXE 17: Analyse de la variance des Longueurs des microconidies de quatre isolats de *F.solani***

	DLL	CM	test F	CV
Var totale	49	0.76		
Var facteur 1	4	6.78	35.02	
Var Bloc	9	0.37	0.0806	
Var résiduelle 1.	36	0.19		8.1%

**ANNEXE 18: Analyse de la variance des longueurs des macroconidies de quatre isolats de *F.solani***

	DLL	CM	test F	CV
Var totale	49	56.86		
Var facteur 1	4	699.28	967.69	
Var Bloc	9	6.78	9.38	
Var résiduelle 1.	36	0.72		2.9%

**ANNEXE 19: Analyse de la variance de la pathogénécité de 11 isolats de *Fusarium spp* sur la lentille (var: Syrie 229).**

	DLL	CM	test F	CV
Var totale	89	704.07		
Var facteur 1	4	2433.05	193.38	
Var.facteur.2	5	8482.79	674.22	
Var Inter F1.2	20	488.06	38.79	
Var résiduelle 1.	60	12.58		11.1%

**ANNEXE 20: Analyse de la variance de la sensibilité de 11 variétés de lentille vis à vis de quatre isolats de *F.solani*.**

	DLL	CM	test F	CV
Var totale	131	103.51		
Var facteur 1	13	1189.71	403.71	
Var.facteur.2	110	844.47	286.56	
Var Inter F1.2	130	42.88	14.55	
Var résiduelle 1	88	2.95		2.9%

**ANNEXE 21: Analyse de la variance sur la spécificité parasitaire de quatre isolats de *F.solani* vis à vis de sept espèces végétales.**

	DLL	CM	test F	CV
Var totale	71	2.67		
Var facteur 1	3	0.68	14.50	
Var.facteur.2	5	36.34	776.47	
Var Inter F1.2	15	0.23	4.84	
Var résiduelle 1	48	0.05		9.7%

**ANNEXE 22: Analyse de la variance de l'activité peroxydasique**

	DLL	CM	test F	CV
Var totale	11	0.01		
Var facteur 1	1	0.02	26516.03	
Var.facteur.2	1	0.03	41078.10	
Var Inter F1.2	1	0.01	8235.09	
Var résiduelle 1.	8	0.00		0.1%

**ANNEXE 23: analyse de la variance de l'activité des polyphénoloxydases**

	DLL	CM	test F	CV
Var totale	11	0.03		
Var facteur 1	1	0.24	176777.72	
Var.facteur.2	1	0.09	66290.31	
Var Inter F1.2	1	0.00	552.11	
Var résiduelle 1.	8	0.00		0.2%

**ANNEXE 24: analyse de la variance de l'activité de la catalase**

	DLL	CM	test F	CV
Var totale	11	0.00		
Var facteur 1	1	0.00	92.45	
Var.facteur.2	1	0.00	344.45	
Var Inter F1.2	1	0.00	22.06	
Var résiduelle 1.	8	0.00		0.1%

**ANNEXE 25: analyse de la variance de l'activité de l'acide ascorbique oxydase.**

	DLL	CM	test F	CV
Var totale	11	0.04		
Var facteur 1	1	0.04	0.98	
Var.facteur.2	1	0.05	1.27	
Var Inter F1.2	1	0.04	0.99	
Var résiduelle 1.	8	0.04		16.1%

Contribution à l'étude de la pourriture racinaire et du flétrissement vasculaire de la lentille causées par *Fusarium solani* (Mart) Appel & Wr et *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* Vasd and Brin dans deux régions de l'ouest algériens.

#### RESUME:

La culture de la lentille dans les deux régions de l'ouest (Tiaret et Tissemsilt) est depuis quelques années confrontée aux maladies de flétrissement et de pourriture racinaire.

L'étude de la mycoflore transmise par semence, a permis de montrer que les variétés locales transmettent le *F. solani* et à un moindre degré le *F. oxysporum*. Les cultivars introduits se sont montrés eux aussi, vecteurs de ces deux agents avec cependant des degrés relativement faibles.

En traitant le problème du complexe de flétrissement et de pourriture racinaire, nous avons mis en évidence dans un premier temps la présence du *F. solani* agent de la pourriture racinaire dans les deux régions inspectées alors que la présence de *F. oxysporum* f.sp. *lentis* se trouve limitée uniquement à deux parcelles seulement à savoir celle se trouvant dans la région de Dahmouni (Tiaret) et dans la région de Sabiine (Tissemsilt).

Le test de pathogénéicité étudié sur les huit isolats de *Fusarium solani* et trois isolats de *F. oxysporum*, nous ont permis de vérifier l'agressivité de certains isolats et par la même occasion évaluer leur pouvoir pathogène.

La tentative d'approche électrophorétique pour caractériser les différents isolats de *F. solani* et le *F.o.l.*, nous a permis de différencier entre les deux espèces de *Fusarium* par simple observation de leur zymogramme grâce aux nombres de bandes électrophorétiques rencontré au niveau des deux systèmes enzymatiques étudiées à savoir les estérases et les malates déshydrogénases.

Nous avons pu montrer également que les polyphénols, les peroxydases et les polyphénoloxydases sont des substances qui se trouvent en quantité relativement importante chez la variété résistante par rapport à la variété sensible. Par contre l'acide ascorbique-oxydase et les catalases, semble n'avoir aucun rôle précis dans le phénomène de résistance.