

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre 1 : Etude bibliographique	4
1. La plante hôte	5
1.1. Les <i>Solanacées</i>	
1.2. La tomate	5
1.3. La pomme de terre	7
1.4. Importance économique	8
1.5. Pratiques culturales en Algérie	9
2. Le pathogène	12
2.1. Généralités sur les <i>Alternaria</i>	
2.2. Historique de la taxonomie d' <i>Alternaria</i>	12
2.3. Classification et biologie des <i>Alternaria</i>	13
2.4. Les <i>Alternaria</i> pathogènes des solanacées	15
2.5. Symptomatologie	16
2.5.1. Sur feuilles	16
2.5.2. Sur tiges et collets	17
2.5.3. Sur fruits et tubercules	18
2.7. Cycle infectieux	20
2.7.1. Conservation, sources d'inoculum	20
2.7.2. Pénétration et invasion	21
2.7.3. Sporulation et dissémination	22
2.7.4. Conditions favorables à son développement	22
2.8. Les différentes approches taxonomiques	25
2.8.1. L'approche phénotypique	25
2.8.2. Culture sur milieux classiques	28
2.8.3. L'approche moléculaire	29
2.8.3.1. Outils moléculaires modernes et taxonomie	29
2.8.3.2. Etude de la variabilité interspécifique	30
2.8.3.3. Immuno-taxonomie et électrophorèse des protéines	32
2.8.3.4. Méthodes chimiques	32
2.9. Les <i>Alternaria</i> producteurs de mycotoxines	33
3. Méthodes de lutte contre <i>Alternaria</i>	34
3.1. Pratiques culturales	35
3.2. La lutte génétique	36
3.3. Extraits de plantes	37
3.4. La lutte biologique	39
3.5. La lutte chimique	41
3.5.1. Substances utilisées pour lutter contre l'alternariose des <i>Solanacées</i>	43
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes	46
I. Diagnostic, Prospections sur terrain et étude épidémiologique	47
1. Echantillonnage	47
2. Isolement et purification de l'agent pathogène	48

2.1. Induction de la sporulation des isolats	48
2.2. Mesure de la sporulation fongique	49
2.3. Culture d'isolats monospores	49
2.4. Conservation des isolats	49
II. Identification morphologique et étude des caractères cultureux	49
1. Introduction	
2. Etude des caractères macroscopiques et microscopiques	50
2.1. Evaluation des caractères morphologiques macroscopiques	50
2.2. Examen de la morphologie et de la formation des chaînes de conidies	50
3. Effet des différents milieux de culture	51
4. Effet de différentes sources de carbone et d'azote	51
5. Effet de la température et du pH	52
6. Mesure de la croissance mycélienne et la sporulation	52
7. Analyse statistique	53
III. Identification moléculaire des souches	53
1. Introduction	
2. Détection moléculaire des <i>Alternaria sp.</i> sur tissus infectés	54
3. Extraction de l'ADN fongique	55
4. Caractérisation moléculaire des isolats	55
5. Dosage des acides nucléiques	57
6. Réaction par amplification PCR et électrophorèse sur gel	57
7. Purification des produits PCR ITS1 F-ITS4 et facteur d'élongation	58
8. Séquençage	58
IV. Test du pouvoir pathogène	59
1. Introduction	
2. Méthode des folioles détachées	60
2.1. Préparation de l'inoculum	60
2.2. Inoculation des feuilles détachées	61
3. Test sur plantules de tomates	62
3.1. Le matériel végétal	62
3.2. Réaction variétale	63
3.3. Evaluation de l'agressivité de différentes espèces sur plantules de tomate	63
4. Inoculation des plantes testées	65
5. L'incidence de la maladie	65
6. Ré-isolément du parasite	66
V. Lutte chimique	66
1. Introduction	
2. Analyse de la sensibilité osmotique	66
3. Sensibilité vis-à-vis certaines matières actives	67
Chapitre 3 : Résultats et Discussions	71
I. Etude épidémiologique	72
1. Echantillonnage et fréquence des isolements	
2. Diagnostic moléculaire	77

II. Identification morphologique et étude des caractères cultureux	82
1. Isolement et purification de l'agent pathogène	
2. Etude des caractères macroscopiques et microscopiques	89
2.1. Evaluation des caractères morphologiques macroscopiques	
2.2. Examen de la morphologie et de la formation des chaînes de conidies	94
3. Effet des milieux de base	99
4. Effet des sources de carbone et d'azote	101
5. Effet du pH et de la température	107
6. Analyse globale de la variabilité culturelle et physiologique des isolats	109
III. Identification moléculaire des souches	111
1. Séquençage des régions ITS	111
2. Séquençage des régions codant pour les facteurs d'élongation	114
3. Utilisation des amorces spécifiques	115
IV. Test du pouvoir pathogène	117
1. Test sur feuilles détachées	
2. Test sur plantules de tomates	121
2.1 Réaction variétale	
2.2.2. Symptomatologie	125
2.3. Infection individuelles et mixtes	129
2.3.1. Infections individuelles	
2.3.2. Infections mixtes	134
2.3.3. Postulats de Kock	138
2.3.4. Détection moléculaire d' <i>Alternaria sp.</i>	140
V. Lutte chimique	142
1. Analyse de la sensibilité osmotique	
2. Sensibilité vis-à-vis certaines matières actives	144
Chapitre 4 : Conclusions générales et Perspectives	148
1. Etude épidémiologique	149
2. Isolement et identification des espèces	150
3. Étude physiologique	151
4. Identification moléculaire	151
5. Pouvoir pathogène	152
6. Lutte chimique	154
Références bibliographiques	155
Annexes	186

Liste des abréviations

×g	force gravitationnelle
µg	microgramme
µl	microLitre
µm	micromètre
µM	micromolaire
A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNr	acide désoxyribonucléique ribosomal
AFLP	polymorphisme d'ADN obtenu par amplification au hasard
ATP	adénosine triphosphate
AUDPC	Aire sous la courbe de l'évolution de la maladie (Area under disease progress curve)
BET	Bromure d'ethidium
C	cytosine ou concentration de l'oligonucléotide (selon le contexte)
C°	degré Celcius
CI50	Concentration d'inhibition de 50%
cm	centimètre
ddNTP	didésoxyribonucléoside (A, C,G, T) triphosphate
dNTP	désoxyribonucléoside (A, C,G,T) triphosphate
DPI	Jour après inoculation (day post inoculation)
EDTA	éthylène diaminotétraacétique
ELISA	Essai réalisé avec un enzyme lié à un anticorps (Enzyme-linked immunosorbent assay)
f. sp.	Forme spéciale
g	gramme
G	guanine
GSU	grande sous-unité
HPLC	chromatographie liquide à haute pression (performance)
IGS	espaceur non transcrit des gènes d'ADNr (Intergenic spacer)
ITS	espaceur interne transcrit des gènes d'ADNr (Internal Transcribed Spacer)
JPI	jours post inoculation
Kb	kilo base
L	litre
m	mètre
M	molaire (concentration en mole/Litre)
MEA	milieu à base d'extrait de malt
Mg	milligramme
Min	minute
mL	millilitre
mM	millimolaire
Mm	millimètre
NAD+	forme oxidée de nicotinamide adénine din ucléotide
Ng	nanogramme
nm	nanomètre
Pa Vé	Pathologie végétale
pb	paire de bases

PCA	milieu à base d'agar, de carotte et de pomme de terre
PCR	amplification <i>in vitro</i> de l'ADN (polymerase chain reaction)
phenol-chlo-iso	Phénol Chloroforme alcool isoamylique
Pm	poids moléculaire
PM	picomole (10^{-12})
pmol	petite sous-unité
ppm	Partie par million
PSA	milieu à base d'agar, de saccharose et de pomme de terre
qsp	Quantité suffisante pour
RFLP	polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (restriction fragment length polymorphisms)
SDS	sodium dodécyl sulfate
sec	seconde
syn	synonyme
T	thymine
TAE	tampon Tris-EDTA, acide acétique
TBE	tampon Tris-EDTA, acide borique
TE	Tampon d'extraction
Tm	température où 50% des oligonucleotides sont dissociés de l'ADN
Tris	2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1-3-propanediol
UMR	Unité Mixte de Recherche
UV	ultraviolet.
V	volt
var.	variété

Liste des figures

Figures 1 : Cultures de tomate à différents stades dans les wilayas : (A) Mostaganem (Juin), (B) Ain Témouchent (Juillet), (C) Oran ITCMI serre (Décembre).	11
Figure 2 : Représentation des différents stades de développement des spores et conidiophores d' <i>Alternaria alternata</i> (Simmons, 1999 ; Taralova <i>et al.</i> , 2011).	15
Figure 3 : Symptômes de l'alternariose sur feuille de tomate	17
Figure 4 : Lésions provoquées par <i>Alternaria tomatophila</i> et <i>A. alternata</i> sur tige et collet	18
Figure 5 : Lésions sur fruits de tomates commercialisés provoquées par <i>Alternaria tomatophila</i> (A) et par <i>A. solani</i> (B), <i>A. arborescens</i> et <i>A. alternata</i> (C).	19
Figure 6 : Cycle infectieux de l'Alternariose	23
Figure 7 : Le processus d'infection, le développement et les symptômes des maladies causées par <i>Alternaria</i> pathogènes des solanacées	24
Figure 8 : Agencement des conidies de :(A) <i>A. alternata</i> , (B) <i>A. arborescens</i> et (C) <i>A. tenuissima</i> généré avec l'outil de modélisation élaboré par Taralova <i>et al.</i> , (2011)	26
Figure 9 : Conidies et conidiophores de la souche <i>A. solani</i> représentative E.G.S. 44 098 (Simmons, 2007) CBS fungal diversity, 185- 187.	27
Figure 10 : conidies et conidiophores de la souche <i>A. tomatophila</i> représentative E.G.S. 42 165 (Simmons, 2007) CBS fungal diversity, 203- 205.	28
Figure 11 : Sites d'action des principaux fongicides (Lepiovre, 2003).	42
Figure 12 : Méthode de routine pour l'identification des espèces.	54
Figure 13 : Méthode de détection rapide.	55
Figure 14 : L'arrangement des gènes et des séquences inter géniques nucléaire dans la région d'ADNr et la localisation des ITS1, ITS4.	59
Figure 15 : L'arrangement des gènes et des séquences inter géniques nucléaire dans les régions des facteurs d'élongations et la localisation des amorces EF1-728 et EF1-986 dans cette région (Carbone & Kohn, 1999).	59
Figure 16 : (A) germination des graines de tomates après 5 jours d'incubation ; (B) plantules de tomates cultivées sou serre âgées de 4 semaines.	63
Figure 17 : Fréquence de l'isolement dans les Wilaya du Nord-Ouest Algérien.	72
Figure 18 : Les principaux agents de la brûlure foliaire des solanacées isolés dans les Wilayas du Nord-Ouest Algérien.	73
Figure 19 : Incidence des principaux agents de l'Alternariose des solanacées détectés par PCR à partir des échantillons prélevés dans les Wilayas du Nord-Ouest Algérien.	79
Figure 20 : Détection des <i>Alternaria sp.</i> dans les tissus infectés de solanacées collectés dans différentes régions	80
Figure 21 : Aspect des colonies des souches à petites spores (section <i>alternata</i>) cultivées sur milieu PSA.	92
Figure 22 : Aspect des colonies des souches à grosses spores (section <i>porri</i>) cultivées sur milieu PSA.	93
Figure 23 : La variabilité de la vitesse de croissance chez les différentes espèces d' <i>Alternaria</i> sur un milieu de PSA.	94
Figure 24 : Paramètres morphologiques des spores des isolats de la section <i>porri</i>	96
Figure 25 : Les espèces d' <i>Alternaria</i> à petites spores de la section <i>alternata</i>	98
Figure 26 : Les espèces d' <i>Alternaria</i> à grosses spores de la section <i>porri</i>	99
Figure 27 : La variabilité du taux de croissance (A) et de sporulation (B) des isolats <i>Alternaria sp.</i> sur différent milieux.	100
Figure 28 : Aspect des colonies des <i>Alternaria sp.</i> cultivées sur différents milieux de culture	101
Figure 29 : La variabilité du taux de croissance (A) et de sporulation (B) des isolats	104

<i>Alternaria sp.</i> sur différentes sources de carbone et d'azote	
Figure 30: Aspect des colonies des <i>Alternaria sp.</i> cultivées sur dix sources de carbone sur milieu Czapek modifié	105
Figure 31: Aspect des colonies des <i>Alternaria sp.</i> cultivées sur huit sources d'azote sur milieu Czapek modifié.	106
Figure 32: Effet des différents pH sur la croissance mycélienne d' <i>Alternaria sp.</i> après huit jours d'incubation	107
Figure 33: Effet des différentes températures sur la croissance mycélienne d' <i>Alternaria sp.</i> après huit jours d'incubation.	108
Figure 34: La variabilité du taux de croissance (A) et de sporulation (B) des isolats <i>Alternaria sp.</i> sur différentes températures et pH.	109
Figure 35: Dendrogramme représentant l'analyse statistique à partir des caractères morphologiques, culturaux et physiologiques de 32 souches à petite spores et 4 souches à grosses spores	110
Figure 36: Dendrogramme représentant l'analyse phylogénétique des <i>Alternaria sp.</i> comparés aux séquences référencées et genres apparentés à partir des données de séquences ITS des régions combinées des gènes ribosomiques.	113
Figure 37: Alignements des séquences du gène de facteur d'élongation (EF-1 α) d' <i>A. solani</i> et <i>A. tomatophila</i>	114
Figure 38: Amplification des ADN extraits à partir des souches <i>Alternaria sp.</i> avant séquençage	115
Figure 39: Profils des gels des produits PCR des espèces d' <i>Alternaria</i> à grosses spores	116
Figure 40: Identification des <i>Alternaria</i> à petites spores.	116
Figure 41 : Effet des inoculations à partir des 32 isolats de la section <i>alternata</i> avec fragments mycéliens et effet de la blessure des folioles sur la taille des lésions.	118
Figure 42. Inoculations à partir des suspensions de spores des 32 isolats de la section <i>alternata</i> et effet de la blessure de folioles sur la taille de la lésion.	118
Figure 43: Test de pathogénicité des isolats de la section <i>alternata</i> et développement de l'alternariose sur folioles de tomate détachées sans blessures	120
Figure 44: Symptômes observés après 21 jours post-inoculation avec les isolats de la section <i>alternata</i> .	128
Figure 45: (A) chaîne de conidies et mycélium produit sur la face supérieure de la feuille de tomate infectés par la souche <i>A. alternata</i> 156, (B) symptômes typiques de la pourriture du collet sur trois cultivars de tomates induits par <i>A. arborescens</i> 65.	129
Figure 46: Pathogénicité d' <i>A. tomatophila</i> , <i>A. solani</i> et <i>A. alternata</i> sur plantules de tomates 7 jours après l'inoculation.	133
Figure 47 : Infections mixtes et individuelles sur plantules de tomate avec isolats d' <i>A. solani</i> et de la section <i>alternata</i> .	136
Figure 48: Infections mixtes et individuelles sur plantules de tomate avec les isolats d' <i>A. tomatophila</i> et de la section <i>alternata</i> .	137
Figure 49: Sporulation sur tissus de tomates infectées issues des inoculations en laboratoire.	140
Figure 50: Détection des espèces d' <i>Alternaria</i> à partir de feuilles de tomates inoculées pendant 21 jours	141
Figure 51: Effet du NaCl à 2% et 4% sur la croissance mycélienne des souches de la section <i>alternata</i> après six jours d'incubation.	143
Figure 52: Sensibilité osmotique des isolats de la section <i>alternata</i> .	144
Figure 53: Effet des neuf matières actives sur la croissance mycélienne de la souche A2	146
Figure 54: Effet des neuf matières actives sur la croissance mycélienne de la souche A11	146

Liste des tableaux

Tableau 1: Production mondiale de tomate en 2012 (http://faostat.fao.org/)	6
Tableau 2: Production mondiale de pomme de terre en 2012 (http://faostat.fao.org/)	8
Tableau 3: Principales cultures maraichères et industrielles en Algérie	9
Tableau 5: La production de mycotoxines par différentes espèces d' <i>Alternaria</i> à l'exception d' <i>Alternaria alternata</i>	34
Tableau 6 : Études génétiques classiques de la résistance à l'alternariose engendrant la brûlure foliaire, dépérissement du collet, et de la lésion des tiges de la tomate.	37
Tableau 7 : Quelques antagonistes microbiens utilisés pour le control d' <i>Alternaria spp.</i> sur fruits et légumes	40
Tableau 8 : Les matières actives recommandées pour les cultures de tomate et de pomme de terre (ITCMI, 2010)	43
Tableau 9 : Echelle de notation de la vitesse croissance et de la sporulation des espèces testés	53
Tableau 10 : Les amorces testées et leur séquence nucléotidique	56/ 57
Tableau 11 : Chronologie des étapes.	61
Tableau 12 : Echelle de notation de l'incidence de la maladie	64
Tableau 13: Matières actives testées et synthétisées au laboratoire de chimie organique appliqué de l'Université d'Oran	68
Tableau 14: Fréquence de l'isolement des principaux agents associés à la détérioration des solanacées	76
Tableau 15: Diagnostic par PCR des espèces d' <i>Alternaria</i> dans les échantillons de tissus infectés.	77
Tableau 16: L'hôte et l'identification morphologique des souches isolées utilisés dans chaque analyse au cours de cette étude et l'identification moléculaire ultérieur.	83
Tableau 17: Caractères Cultureux des isolats <i>Alternaria</i> sur milieu PSA.	90
Tableau 18: Variabilité dans le cloisonnement et la taille des conidies de 36 isolats d' <i>Alternaria sp.</i>	95
Tableau 19: Classement non hiérarchique des isolats de la section <i>alternata</i> en deux groupes en fonction de leur virulence sur folioles de tomate détachées.	121
Tableau 20: Incidence de la maladie en pourcentage et AUDPC des souches <i>A. alternata</i> et <i>A. arborescens</i> sur les variétés de tomates évaluées sous serre.	122
Tableau 21: Incidence de la maladie en pourcentage et AUDPC des souches <i>A. tenuissima</i> sur les variétés de tomates évaluées sous serre.	123
Tableau 22: Effet des isolats à petites spores sur le développement des symptômes sur les plantules de tomates cultivées sous serre	127
Tableau 23 : Variabilité du pouvoir pathogène des <i>Alternaria</i> du groupe <i>alternata</i> et <i>porri</i> sur plantules tomates	130
Tableau 24: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne chez les isolats de la section <i>alternata</i> sur milieu PSA+ 2%NaCl et PSA+ 4%NaCl	142
Tableau 25: Concentrations inhibitrices (ppm) de la croissance mycélienne des souches (A2 et A11) en présence de neuf fongicides après six jours de culture sur milieu PSA à 25°C.	145

Introduction

Clicours.COM

Les espèces du genre *Alternaria* sont répandues à grande échelle. Une partie considérable des espèces sont cosmopolites. Selon leur style de vie saprophytes ils se développent sur les parties mortes des plantes. Une partie d'entre eux jouent un mode de vie parasite nécrotrophes et une qui cause de graves maladies, ces espèces sont considérées comme un véritable organisme nuisible spécifique de l'hôte. Les symptômes causée par ces pathogènes se présentes généralement sous formes de taches brunes à noirâtre sur les *Solanacées*, les dégâts causés par les principaux agents de l'alternariose se traduisent par des brûlures au niveau des feuilles, des tiges, des collets et des fruits. Cette maladie engendre la diminution du pouvoir germinatif des semences, la détérioration des produits avant la récolte ou encore la perte des produits récoltés pendant le stockage et représente donc un risque pour la sécurité alimentaire.

La recherche du genre *Alternaria* s'est imposée au niveau international dans ces deux dernières décennies, comme il est apparu qu'ils sont étroitement liés à la contamination des aliments par les mycotoxines, aux allergies et à l'asthme.

En Algérie, les *Solanacées* ont une place économique importante, peu d'informations datées sur le plan épidémiologique sont disponibles, de même concernant la biodiversité des espèces d'*Alternaria* pathogènes de cette famille de plantes, ce qui explique la nécessité de les traiter sur différents niveaux avec l'application de techniques de mycologie classiques et modernes. L'application de fongicides est la pratique la plus couramment utilisée pour réduire les pertes liées à cette maladie. Cependant, à ce jour, aucune réduction constante de la maladie n'a été atteinte grâce à des applications chimiques. Ceci suggère que des informations supplémentaires relatives à la biologie de l'agent pathogène et l'épidémiologie de la maladie sont nécessaires pour la réussite du développement d'un programme de gestion fiable de l'alternariose. En outre, l'analyse visuelle des symptômes ne permet pas de distinguer si la tache nécrotique est causée par *A. tomatophila*, *A. solani* ou les espèces à petites spores de la section *alternata*. Dans cette étude, lors des prospections sur terrain, un diagnostic par PCR a été utilisé afin d'obtenir une différenciation claire et la distribution des espèces d'*Alternaria* sur les tissus infectées et pour compléter d'une autre part les tests de diagnostic classique.

L'identification des *Alternaria* basée exclusivement sur la morphologie des conidies est souvent difficile pour les espèces étroitement liées, et ce en raison des variations qui se posent à la suite du fait que les caractéristiques morphologiques sont très sensibles aux conditions de culture; même les comparaisons en cultures *in vitro* sont difficiles. Des caractéristiques autres que la morphologie, par conséquent, sont utilisées à des fins taxonomiques. La combinaison

des critères de la morphologie des conidies, l'identification moléculaire, et la pathogénicité se s'est montré efficace et utile dans taxonomie des *Alternaria* (Simmons et Roberts, 1993). En effet, aujourd'hui beaucoup d'informations mises à jour concernant la composition du genre *Alternaria*, leur classification basée sur des caractères morphologiques et moléculaire s'est amélioré par de nouveaux résultats, à savoir possibilité de diviser espèces à petites spores dans différentes sections (Woudenberg *et al.*, 2013).

Notre objectif principal est de fournir des informations complémentaires sur la ségrégation des espèces isolées au Nord-Ouest Algérien sur la base de la morphologie, de la physiologie et de l'étude moléculaire, selon lesquels, les différentes étapes de notre étude sont menées de la manière suivante:

Une quantification du parasite indirect à partir de plantes infectées collectées dans 65 régions à maraichage intensif sélectionnées au hasard durant les saisons de 2011 à 2013;
Un examen des traits morphologiques des *Alternaria* isolés et purifiés pour la ségrégation des espèces à petites et à grosses spores selon leurs critères morphologiques basés sur l'examen phénotypique et une étude des caractères cultureux;

Une analyse de la variabilité physiologique des deux groupes d'espèces par une étude statistique et comparative avec établissement d'un dendrogramme à partir des données issues de l'étude des exigences nutritionnelles vis à vis différentes sources de carbone et d'azote ainsi que celles de l'effet de la température et du pH, évaluées sur la croissance mycélienne et la sporulation de chaque souche;
Une identification moléculaire des souches par séquençage des régions ITS et facteur d'élongation de chaque groupe d'espèce et confirmation de la ségrégation basée sur l'examen phénotypique par PCR au biais d'amorces spécifiques;
Une quantification de la maladie par l'étude du pouvoir pathogène des différents groupes d'espèces afin de différencier les souches saprophytes des souches pathogènes, et ce par différentes méthodes ainsi que l'évaluation de l'agressivité des pathotypes en inoculations croisées;

Une évaluation de la résistance des essais *in vitro* à quelques matières actives fongicides pour la mise au point d'une méthode de lutte chimique.

Chapitre 1 :
Etude bibliographique

Introduction

Les légumes constituent la composante la plus importante et peu coûteuse d'une alimentation équilibrée qui sont tenues en compte en raison de leurs valeurs nutritives élevées et indispensables pour le corps. De ce fait, Il y a des rapports à la demande croissante de fruits et légumes de *Solanacées* sur le marché algérien, nous citons les principales, la tomate et la pomme de terre. L'aspect des maladies de ces cultures maraichères représente un facteur très important dans leur conduite avec une production économiquement viable et respectueuse de l'environnement et surtout pour la santé humaine. Toutefois, les principaux facteurs responsables de la faible production de cette famille de légumes sont les maladies causées par *Alternaria sp.* Les brûlures sont graves et destructrices et le développement de la maladie est si rapide que toute culture est perdue en quelques jours. Dans cette synthèse bibliographique nous avons abordés les principaux axes sur les connaissances du genre *Alternaria* et de son hôte en citant l'importance de la maladie du point de vue économique ainsi que la symptomatologie, nous avons inclus à cela différents travaux sur les moyens de lutte établis à l'heure actuelle. La base théorique de ce travail est liée à cette problématique qui mérite des mesures immédiates et efficaces.

1. La plante hôte

1.1. Les *Solanacées*

Exceptionnellement diversifiée, la famille des *Solanacées* comprend entre 3000 et 4000 espèces, réparties à travers le monde en 90 genres aux morphologies variées : arbres, arbustes, lianes, herbes vivaces ou annuelles. La plupart des espèces poussent dans les régions tropicales, plus particulièrement en Amérique du sud. La famille des *Solanacées* revêt une grande importance économique. En effet, elle renferme beaucoup de plantes ornementales (pétunia, datura, physalis...), industrielles (tabac), et surtout bon nombre de fruits et légumes (tomates, piments, poivrons, aubergine, pomme de terre...). A celles-ci s'ajoutent des plantes médicinales comme la belladone, la jusquiame, la morelle ou la stramoine.

1.2. La Tomate

Originnaire de l'Amérique du Sud, dans la région montagneuse des Andes (Equateur, Pérou, Chili), la tomate fut domestiquée au Mexique, avant d'être importée en Europe au XVI^e siècle par les conquistadores (Peralta *et al.*, 2006). Elle est l'ingrédient de cuisine le plus consommé dans le monde après la pomme de terre. C'est une plante herbacée vivace mais cultivée comme annuelle, aux tiges ramifiées et port rampant. La tige est pubescente, épaisse aux

entre-nœuds. Les feuilles sont composées (5 à 7 folioles), alternées et persistantes. Les fruits sont des baies formées de 2 à 3 loges, à graines très nombreuses, et dont la taille, la forme et la couleur varient avec les différentes variétés. Elle a une température optimale de croissance de l'ordre de 25°C et un thermo-périodisme journalier de 10°C, conditions qu'elle a retenues de son origine montagnarde (Messiaen *et al.*, 1991). L'espèce cultivée de la tomate est communément connue sous le nom de *Lycopersicon esculentum* Mill. La classification de la tomate fut l'objet de nombreuses controverses pendant plusieurs décennies. En effet, se basant uniquement sur des critères morphologiques, taxonomistes et botanistes proposèrent différents noms : *Lycopersicon esculentum* Mill *Solanum lycopersicum* L et *Lycopersicon lycopersicum*. (L.) Karsten (Peralta *et al.*, 2006).

Bien que *Lycopersicon esculentum* soit le nom le plus répandu au sein de la communauté scientifique, des études génomiques récentes confirment l'appartenance de la tomate au genre *Solanum* qui comprend 13 espèces dont l'espèce cultivée (*Solanum lycopersicum*) (Peralta & Spooner, 2001; Spooner *et al.*, 2005). En 2012, la production mondiale de la tomate s'élevait à 133 259 909 t. Les principaux pays producteurs sont la Chine, les USA, l'Inde, la Turquie, l'Egypte, l'Italie, l'Iran, le Brésil et l'Espagne (Tableau 1).

Tableau 1: production mondiale de tomate en 2012 (<http://faostat.fao.org/>)

Position	Région	Production (T)
1	Chine, continentale	50000000
2	Inde	17500000
3	États-Unis d'Amérique	13206950
4	Turquie	11350000
5	Égypte	8625219
6	Iran (République islamique d')	6000000
7	Italie	5131977
8	Brésil	3873985
9	Espagne	4007000
10	Mexique	3433567
11	Ouzbékistan	2650000
12	Fédération de Russie	2456100
13	Ukraine	2274100
14	Nigéria	1560000
15	Portugal	1392700
16	Maroc	1219071
17	Iraq	1100000
17	Tunisie	1100000

1.3. La pomme de terre

La pomme de terre, est un tubercule comestible produit par l'espèce *Solanum tuberosum*, appartenant à la famille des *Solanacées*. Le terme désigne également la plante elle-même, plante herbacée, vivace par ses tubercules en l'absence de gel mais cultivée comme une plante annuelle. La pomme de terre est une plante qui réussit dans la plupart des sols, mais elle préfère les sols légers légèrement acides. La plante est sujette aux maladies dans des sols calcaires ou manquant d'humus. La pomme de terre est originaire de la cordillère des Andes dans le sud-ouest de l'Amérique du Sud où son utilisation remonte à environ 8 000 ans. Introduite en Europe vers la fin du XVI^e siècle à la suite de la découverte de l'Amérique par les conquistadors espagnols, elle s'est rapidement diffusée dans le monde et est aujourd'hui cultivée dans plus de 150 pays sous pratiquement toutes les latitudes habitées. La pomme de terre appartient au genre *Solanum* et plus précisément au sous-genre *Potatoe*, section *Petota*, sous-section *Potatoe*. Cette sous-section se distingue par la présence de tubercules véritables qui se forment à l'extrémité des stolons (Hawkes, 1994). Elle regroupe les espèces de pommes de terre cultivées et les espèces sauvages apparentées (Carlos *et al*, 1991). La série *Tuberosa*, à son tour, se caractérise par ses feuilles imparipennées ou simples, sa corolle ronde ou pentagonale et ses baies arrondies (Hawkes, 1990). L'espèce *Solanum tuberosum* se différencie des autres espèces de la même série taxonomique par l'articulation du pédoncule en son tiers médian, les lobes du calice courts et disposés régulièrement, les feuilles fréquemment arquées, les folioles toujours ovales à lancéolées, approximativement deux fois plus longues que larges et les tubercules ayant une période de dormance bien marquée.

La pomme de terre est un élément essentiel à l'alimentation, la production mondiale est de 323 millions de tonnes cultivées sur une superficie de 20 millions d'hectares. Elle occupe le 4^{ème} rang mondial après le riz, le blé et le maïs. La pomme de terre est le légume le plus consommé dans le monde, elle présente en effet l'avantage de produire plus de nourriture nutritive que toute autre grande culture sur moins de terres et que 85% de la plante est comestible pour l'homme, contre environ 50% pour les céréales.

Tableau 2: production mondiale de pomme de terre en 2012 (<http://faostat.fao.org/>)

Position	Région	Production (T)
1	Chine, continentale	85860000
2	Inde	45000000
3	États-Unis d'Amérique	19165865
4	Fédération de Russie	29532530
5	Allemagne	10665600
6	Ukraine	23250200
7	Bangladesh	8205470
8	Pays-Bas	6765618
9	Pologne	9091900
10	France	6340807
11	République islamique d'Iran	5400000
12	Turquie	4822000
13	Canada	4590296
14	Algérie	4219476
15	Égypte	4500000
16	Royaume-Uni	4553000
17	Pakistan	4104400

1.4. Importance économique

La structuration du maraîchage en Algérie apparaît autour des produits dits principaux comme la pomme de terre, les oignons et la tomate qui occupent 55% du volume produit en maraîchage. Ces plantes maraichères englobent un grand nombre d'espèces végétales destinées à un usage alimentaire et industriel (Anonyme, 2010 ; ITCMI, 2010).

La tomate occupe une place privilégiée dans le secteur maraîcher en Algérie. Elle est considérée à juste titre comme une espèce prioritaire comme la pomme de terre. En ce qui concerne la production maraîchère, la tomate représente 08,79% de production par rapport à la production totale des cultures maraichères et 08,33% par rapport à la production totale des cultures maraichères et industrielles (Snoussi, 2009).

La semence utilisée en Algérie provient totalement de l'étranger et principalement de Hollande, France et d'Amérique (ITCMI, 2010).

Les plantations de pomme de terre occupent 100 000 ha, soit 27 % de la superficie totale consacrée aux cultures maraichères. La production de l'année 2007 a été de 14 210 088 qx, soit 24 % de la production totale maraîchère, avec un rendement moyen de 120 qx/ha, pour une valeur estimée à 52 milliards de DA. La production a connu une augmentation considérable de 42194760 qx en 2012. La pomme de terre reste un produit de base pour le consommateur Algérien (60 kg habitant/an). Cette filière à travers ses différents segments en

amont et en aval compte 17 421 unités et emploi. La consommation moyenne par habitant, de plus de 50 kg se rapproche des niveaux européens (Benaïssa *et al.* 2009).

Tableau 3: Principales cultures maraîchères et industrielles en Algérie (MADR, 2009).

Espèces	Superficies Ha	Production Qx	Rdt Qx/Ha	Espèces	Superficies Ha	Production Qx	Rdt Qx/Ha
Tomate industrielle	12 173	3822 731	314,0	Poivron	12 083	1 910 468	158,1
Tabac	4 598	76 677	16,7	Concombre	4 080	1 017 860	249,5
Arachide	2 574	30 570	11,9	Courgette	11 949	1 898 868	158,9
Autres	1 874	69 885	37,3	Aubergine	4 133	763 172	184,7
Total	21 219	3 999 863	188,5	Artichaut	2 724	395 354	145,1
Pommes de terre	105 121	26 360 570	250,8	Choux vert	3 085	467 880	151,7
Tomate	20 789	6 410 343	308,4	Chou-fleur	5 323	818 798	153,8
Oignon	42 662	9 801 602	229,8	Navet	8 187	1 129 590	138,0
Ail	11 193	599 323	53,5	Fèves verte	24 958	2 014 797	80,7
Melon Pastèque	44 791	10 347 220	231,0	Haricot vert	8 918	450 964	50,6
Carotte	16 337	2 712 185	166,0	Petit pois	28 724	1 029 707	35,8
Piment	9 334	1 279 020	137,0	Total	393 594	72 912 950	185,2

1.5. Pratiques culturales en Algérie

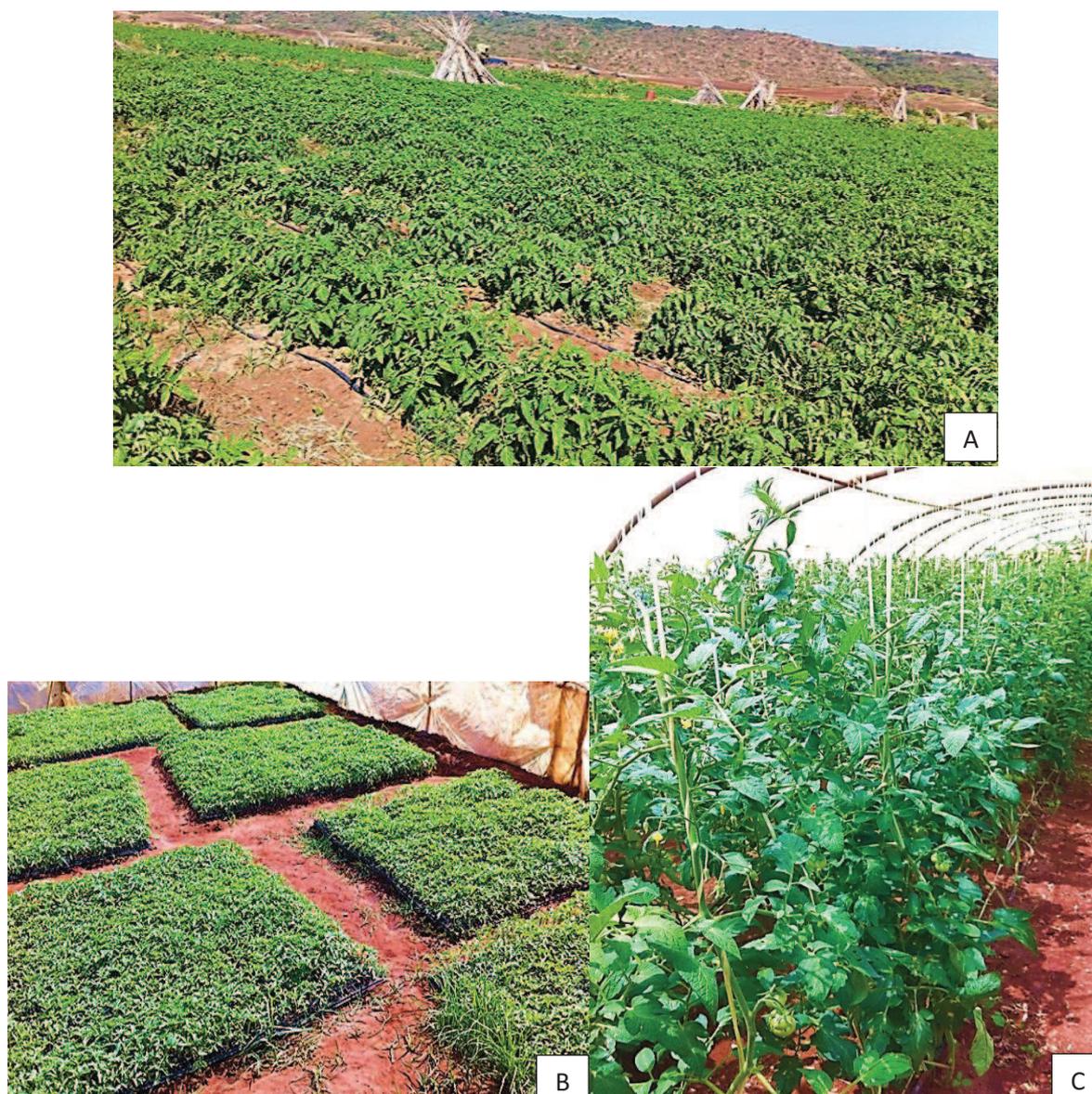
L'histoire des cultures maraîchères, notamment des *Solanacées*, en Algérie se rapporte au climat et à l'eau. Dans chaque région, le calendrier des cultures de chaque variété doit être ajusté aux conditions locales. En ce qui concerne le mode de production, le semis est réalisé en planches ou en pots pour les trois types de cultures : Primeur, Saison et Arrière-saison. La culture sous serre Tunnel (primeur), la culture sous serre multi chapelle (primeur), la culture de plein champ (saison), la culture de plein champ (arrière-saison) (Snoussi, 2009).

La culture de tomate sous serre dite de primeur est pratiquée dans de nombreuses régions selon lesquelles les périodes de plantation diffèrent. Dans le cas du littoral et sublittoral, le semis s'effectue au mois de Novembre, la plantation au mois de Décembre et la récolte à partir du mois d'Avril. Dans les plaines intérieures, le semis s'effectue à la fin décembre jusqu'au mois de Janvier, la plantation au mois de Février et la récolte à partir du mois de

Mai. La culture d'automne se fait à Biskra uniquement, le semis s'effectue au mois d'Août, la plantation au mois de Septembre et la récolte à partir du mois de Décembre jusqu'au mois d'Avril (ITCMI, 2010).

La culture de tomate en plein champ diffère en fonction des saisons, Dans le cas de la culture de saison, le semis s'effectue à partir du mois de Mars jusqu'au mois d'Avril, la plantation d'Avril à Mai et la récolte à partir du mois d'Août. Pour la culture d'arrière-saison le semis se fait début Juillet, la plantation à partir de fin Juillet à Août et la récolte au mois d'Octobre à Décembre (ITCMI, 2010).

Les variétés de tomates fixées non-hybrides les plus utilisées en Algérie sont la Marmande et la Saint Pierre. Les Hybrides sont aussi utilisés pour leur précocité, leur résistance aux maladies et aux attaques parasitaires qui donnent un bon rendement. Les variétés les plus utilisées en Algérie sont : ACTANA, AGORA, BOND, NEDJMA, TAFNA, TAVIRA, TOUFAN, TYERNO et ZAHRA (Snoussi, 2009).



Figures 1 : cultures de tomate à différents stades dans les wilayas : (A) Mostaganem (Juin), (B) Ain Témouchent (Juillet), (C) Oran ITCMI serre (Décembre).

Les périodes de plantation des pommes de terre diffèrent en fonction de la zone, celle de l'arrière-saison se fait de juillet à Septembre, primeur durant les mois d'Octobre, Novembre et de Décembre et celle de saison à partir du mois de Janvier jusqu'au mois d'Avril. Les principales zones de production de pomme de terre en Algérie se situent au Littoral, sublittoral, atlas tellien et hautes plaines. La culture primeur est pratiquée dans les régions de Boumerdes, Tipaza, Skikda, Alger, Mostaganem et de Tlemcen. Les cultures de saison se font dans les régions d'Ain defla, Mascara, Mila, Souk ahras, Boumerdes, Mostaganem, Sétif, Tizi-ouzou, Tiaret, Tlemcen, Batna, Chlef, Bouira et d'El-oued. Les cultures en arrière-saison sont pratiquées dans les régions d'Ain defla, Mascara, Guelma, Chlef, El oued, Tlemcen, Mostaganem et de Djelfa (ITCMI, 2010). La production algérienne, en dehors des cultures «

dites d'été », est assurée par l'importation de plants, qui estimée à 100 000 tonnes de semences de pommes de terre par an, principalement des Pays-Bas (58%), la France (16%) et au Danemark (13%), et une partie de celles-ci sont multipliées localement au printemps pour les cultures d'automne (Corbiere *et al.*, 2010). Les variétés les plus utilisées sont : Ker Pondy, Urgenta, Etoile de Léon, Sientje, Condor, Spunta.

2. Le pathogène

2.1. Généralités sur les *Alternaria*

Les *Alternaria* sont des champignons fréquents dans notre environnement. Ils appartiennent aux moisissures atmosphériques. Ils peuvent être isolés de végétaux très divers. *Alternaria* comprend près de 275 espèces (Simmons, 2007) avec des modes de vie saprophytes et phytopathogènes qui peuvent affecter les cultures sur champ ou les produits végétaux pendant la récolte et post-récolte (Logrieco *et al.*, 2009). Autant que parasites de faiblesse, les *Alternaria* sont capables de mener une existence saprophytique pendant des périodes plus ou moins longues. Certains, tels qu'*A. chartarum*, *A. consortiale*, *A. tenuis*, etc., ont un habitat le plus souvent saprophytique et se rencontrent couramment sur des débris organiques ou les végétaux morts. Quelques espèces, comme *A. solani*, *A. dauci* et ses formes, *A. linicola*, *A. zinniae*, etc., vivent au contraire à l'état de parasites sur des plantes encore apparemment vigoureuses (Messiaen *et al.*, 1991). Ce sont des champignons mésophiles, leurs activités prédominantes disparaissent lorsque la température s'élève (Botton *et al.*, 1990).

Le stockage des graines contaminées peut favoriser l'accumulation de toxines surtout étudiées pour l'espèce *A. alternata*. Les *Alternaria* sont donc des champignons très communs et cosmopolites. Ils peuvent se retrouver sur des substrats très variés : plantes, sols, textiles, graines (Linas *et al.*, 1999). L'air joue un rôle important dans la dispersion des spores. Les spores d'*Alternaria* sont des allergènes. Les spores sont également infectieuses déterminant le plus souvent des formes cliniques cutanéopidermiques favorisées par certains facteurs : diabète mal équilibré, corticothérapie (Badillet, 1991). Les spores fongiques produisent aussi des protéines allergènes qui peuvent causer des maladies immunotoxiques, tels que l'asthme (D'Amato et Spieksma, 1995 ; Dutkiewicz, 1997 ; Bush et Portnoy, 2001). Les chercheurs rapportent un nombre croissant de patients présentant une allergie respiratoire, en particulier les enfants (Emeryk *et al.*, 2004).

2.2. Historique de la taxonomie d'*Alternaria*

Le genre *Alternaria* a été initialement décrit en 1816 avec *A. tenuis*, comme le type et le seul membre du genre (Nees, 1816). Parmi les caractéristiques du genre, la production de chaînes de conidies multicellulaires de couleur foncée avec des cloisons longitudinales et transversales (phaeodictyospores), et d'un bec filamenteux avec des cellules apicales. Depuis sa création, le statut taxonomique du genre a été en mouvement. Dans son œuvre monumentale «Systema Mycologicum», Fries (1832), ne reconnaît pas la description d'*A. tenuis*. Nees a cité cette espèce comme un synonyme de *Torula alternata*. En outre, Fries a érigé un nouveau genre, *Macrosporium*, qui comprend plusieurs espèces qui partagent des caractères phaeodictyosporique avec *Alternaria* et sont actuellement reconnus comme des espèces d'*Alternaria*, notamment *tenuissima*. Il a ensuite identifié les champignons phaeodictyosporique qui ont été attribués à deux : *Alternaria* et *Macrosporium* et aucun consensus clair s'est révélé de plus de 100 ans. Pendant une bonne partie de cette période, de nombreuses espèces *Alternaria* «atypiques» ont été décrites, *Macrosporium* qui ne produisent pas de conidies en chaînes et /ou ont une conidie avec bec. En outre, deux autres genres ont été érigés, *Stemphylium* et *Ulocladium*, qui ont été également caractérisés par la production de phaeodictyospores, ce qui complique la résolution taxonomique de ce groupe de champignons. La confusion croissante sur le statut taxonomique de ces champignons a incité plusieurs re-descriptions de ces genres afin d'accueillir un nombre croissant de nouvelles espèces (Saccardo, 1886 ; Elliot, 1917). En raison de l'ambiguïté, Nees dans « description de l'espèce d'origine pour *A. tenuis* », et celle de Fries « placement erronées générique de *T. alternata* », Keissler (1912) a mis le synonyme à la fois *A. tenuis* et *T. alternata* avec « *Alternaria alternata* Kiessl. » un nouveau nom. Wiltshire (1933, 1938) a en outre proposé des critères révisés pour les genres *Alternaria* ainsi que le genre *Stemphylium*. *Ulocladium* n'a pas été officiellement reconnu, *Macrosporium* a été placé sur la liste des nominations *ambigua*, et beaucoup d'espèces «atypiques» ont été placés dans un sous-genre de *Stemphylium*, *Pseudostemphylium*. Joly (1964) a examiné le genre *Alternaria* et des espèces apparentées, et a proposé que la plupart de ces espèces «atypiques» classées comme *Alternaria* plutôt que *Pseudostemphylium*. Enfin, les concepts modernes de ces genres issues des travaux de Simmons (1967) dans son essai « typification de *Alternaria*, *Stemphylium*, et *Ulocladium* ». Simmons a examiné *Alternaria*, *Stemphylium*, et le genre longtemps négligé *Ulocladium*, et a conclu que la plupart des espèces «atypiques» d'*Alternaria* et de *Stemphylium* doivent être classés comme *Ulocladium*.

2.3. Classification et biologie des *Alternaria*

Les membres du genre *Alternaria* possèdent des conidies septées avec cloisons transversales et longitudinales, les cellules sont multi nucléées (pluricellulaires) de couleur foncée généralement piriformes ou ovotides de tailles variables selon les espèces (Rotem, 1994), Elles possèdent un pigment de type mélanine qui leur servent de protection contre des conditions environnementales défavorables, y compris la résistance aux microbes et enzymes hydrolytiques (Rotem, 1994). Les champignons du genre *Alternaria* sont des *Deuteromycètes* (syn. *Adélomycètes*, *fungi imperfecti*). Cette classe renferme tous les champignons à mycélium cloisonné dont la forme de reproduction est généralement inconnue mais possèdent un mode de multiplication asexuée, par conidies. Certaines espèces d'*Alternaria* ont une reproduction sexuée et leur forme parfaite appartient aux *Loculoascomycètes* (genre *Pleospora* ou *Lewia*) (Ellis, 1971 ; Simmons, 1986 ; Erikson et Hawksworth, 1991). Tous les téléomorphes connus des taxons d'*Alternaria* sont membres du genre d'*Ascomycète Lewia* Barr et Simmons. *Lewia* est une ségrégation d'un groupe hétérogène d'espèces à ascoma « ou ascocarpe » relativement restreint historiquement accumulée dans *Pleospora* Rabh. (*sensu* Wehmeyer, 1961). La relation des taxons d'*Alternaria* du groupe d'espèces *A. infectoria* avec ceux des espèces *Lewia* est maintenant mieux établie à travers les nombreuses études sur les ascospores-à-conidies et les conidies-à-ascoma en cultures axéniques (Simmons, 2007). Les *Alternaria* sont classés dans l'ordre des *hyphales* (Syn. *Moniliales*), ayant des conidiophores peu différenciés, libres, disséminés sur le substrat et à croissance sympodiale et des conidies qui se forment hors d'un concept spécial (Figure 2). La coloration foncée de leur mycélium et de leurs conidies les classent dans la famille des *Dematiaceae* (Agrios, 2005).

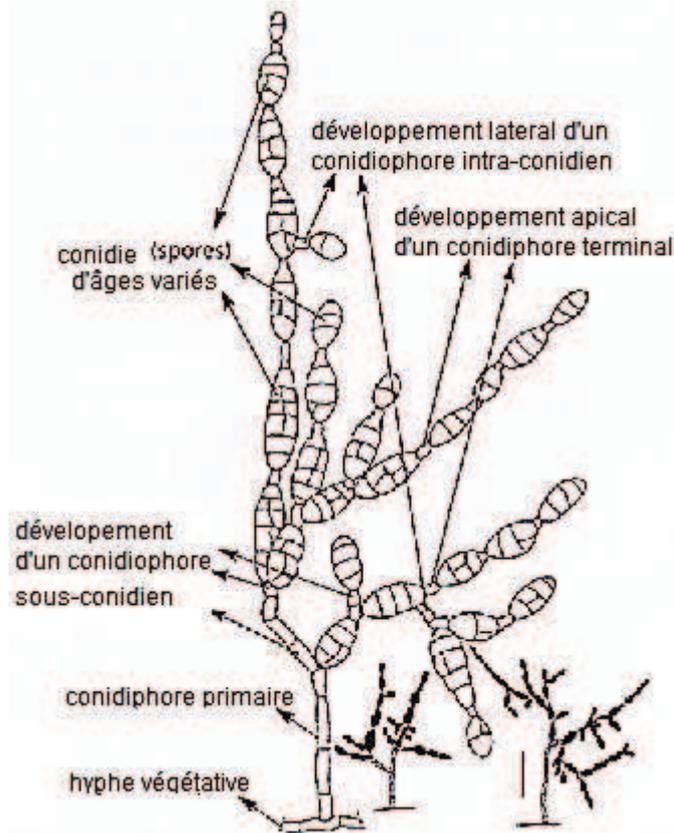


Figure 2 : Représentation des différents stades de développement des spores et conidiophores d'*Alternaria alternata* (Simmons, 1999 ; Taralova *et al.*, 2011).

2.4. Les *Alternaria* pathogènes des *Solanacées*

Alternaria solani est signalé depuis plusieurs décennies comme pathogène des *Solanacées* et a longtemps été décrit comme affectant la tomate, l'aubergine, la pomme de terre, ainsi que plusieurs membres de cette famille botanique (Blancard *et al.*, 2012). Depuis la première description par Ellis et Martin en 1882 (cité dans Sherf et MacNab, 1986), *A. solani*, précédemment connu sous le nom d'*A. porri* f. sp. *solani* (Neergaard, 1945) qui a fait l'objet de nombreuses études (Strandberg, 1992 ; Rotem, 1994). Un champignon ascomycète, *Pleospora solani*, a été revendiquée par Esquivel (1984) comme le stade téléomorphe d'*A. solani*, mais cela n'a pas été confirmé par d'autres. En fait, la situation des *Alternaria* spp. sur ces plantes est beaucoup plus complexe. Ainsi, plusieurs espèces d'*Alternaria* seraient inféodées à plus d'une soixantaine de *Solanacées*. De plus, il apparaît que sur la tomate sévirait plutôt une autre espèce, morphologiquement assez comparable à *A. solani*, dénommée « *Alternaria tomatophila* ». En effet, deux phénotypes existeraient au sein de cette espèce, différenciables par l'aspect de leurs colonies en boîtes de Petri : un phénotype clair, plus agressif sur tomate, et un autre foncé (Frazer, 2002).

A. solani serait l'agent pathogène de l'alternariose de la pomme de terre, et *A. beringelae* E.G. Simmons (2000) sévirait sur aubergine. Il est à noter qu'*A. subcylindrica* E.G. Simmons & R.G. Roberts (2000) a été ponctuellement observé sur feuilles de tomate cerise tout comme *A. cretica* E.G. Simmons & Vakal. (2000) identifié en Grèce sur des lésions foliaires classiques d'alternariose. Il a été signalé aussi qu'*A. subtropica* E.G. Simmons (2000) peut occasionner des taches sur fruits. D'autres *Alternaria* s'attaquent aussi à la tomate comme *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, *A. alternata* et *A. tomato* (Cooke) Jones.

En conclusion

Les études présentées vont dans le sens de l'existence de plusieurs taxons responsables de la brûlure foliaire chez les *Solanacées* comme *A. tomatophila*, *A. solani*, *A. alternata*, *A. arborescens* et *A. tenuissima*.

2.5. Symptomatologie

Les symptômes de la brûlure foliaire provoqués par les *Alternaria* pathogènes à grosses et à petites spores sont souvent très similaires, plusieurs de ces espèces peuvent être présentes sur le même hôte dans des conditions favorables à leur développement.

2.5.1. Sur feuilles

Les attaques débutent à partir des feuilles basses, âgées et déjà séniles. Il est rare de les voir s'installer directement sur un organe sain, leur implantation exige un affaiblissement physiologique; une simple blessure sur un organe vigoureux est souvent suffisante pour permettre l'infection directe (Messiaen *et al.*, 1991). Les premiers symptômes de la maladie dans les champs sont précoces et se traduisent par l'apparition de petites lésions ovales et circulaires noires de 1 mm de diamètre sur les tiges et les feuilles. Par la suite, elles s'étendent progressivement et s'auréolent d'un halo jaune souvent bien marqué. Atteignant plusieurs millimètres, elles révèlent souvent de discret anneaux concentriques d'un brun plus foncé (Blancard *et al.*, 2012). Les lésions deviennent parfois irrégulières car elles se développent et fusionnent entre elles. Dans des conditions favorables, les infections graves peuvent éventuellement entraîner la mort des feuilles voir la plante. Les lésions sont d'abord superficielles et deviennent déprimés au fur et à mesure qu'elles se développent. Les feuilles atteintes jaunissent et au final toute la surface du limbe se dessèche. En plus des taches foliaires. Une chlorose suivie de la mort des feuilles est observée quand une lésion de la tige se trouve à l'aisselle de la feuille (Lopes *et al.* , 1994).

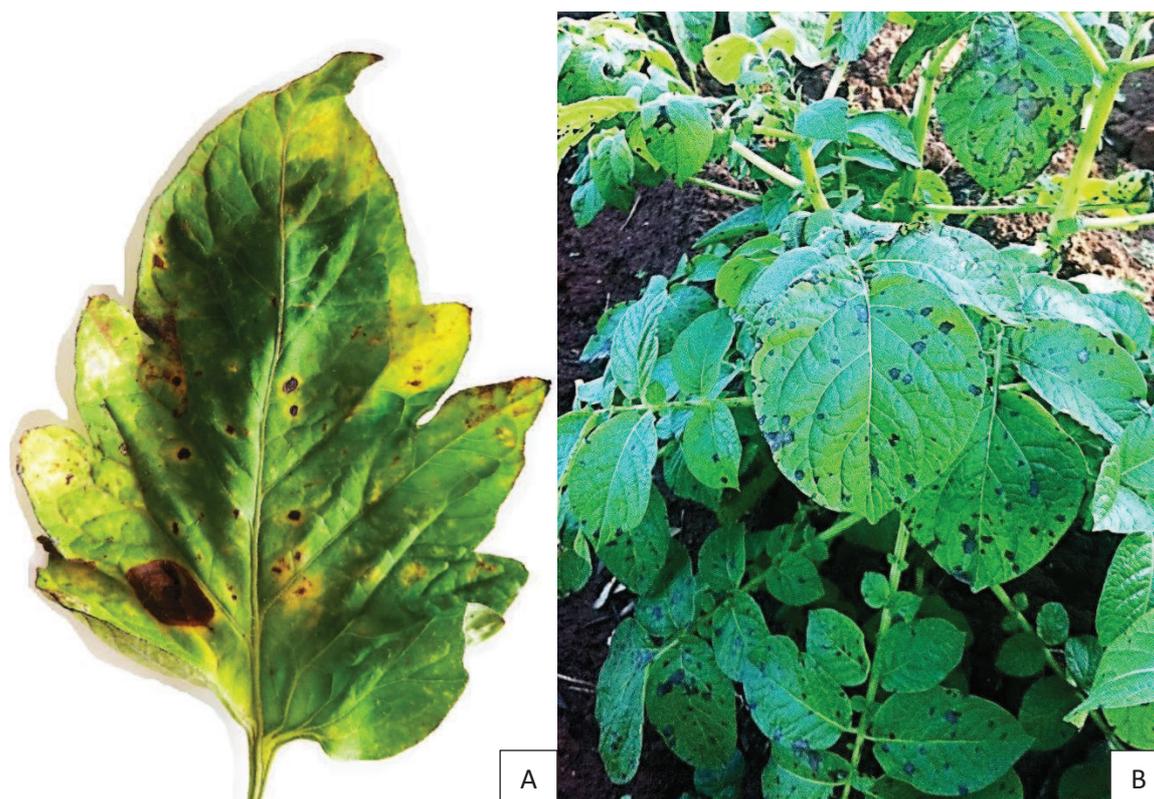


Figure 3 : Symptômes de l'alternariose: **A.** taches sur foliole de tomate provoquées par *Alternaria tomatophila* et *A. alternata* (*sensu lato*); **B.** taches sur feuilles de pomme de terre provoquées par *A. solani* et *A. alternata* (*sensu lato*).

2.5.2. Sur tiges et collets

Le pathogène peut aussi provoquer de graves lésions sur tiges qui peuvent atteindre jusqu'à 5 cm de longueur. Quand des conditions météorologiques sont favorables, les lésions se développent sur les tiges et les pétioles (Grogan *et al.*, 1975 ; Vloutoglou et Kalogerakis, 2000 ; Verma et Verma, 2010). Le dépérissement des extrémités du collet est un autre symptôme associé à la maladie (Patterson, 1991) (figure 4 B), les lésions ne parviennent pas à ceinturer les tiges en particulier avec les variétés qui ont des tiges plus épaisses (Lopes *et al.*, 1994). Ce symptôme est rare en temps de pluie, sauf sur les variétés avec des tiges et des pétioles plus minces. Le dépérissement est généralement commun par temps sec, les lésions sur les tiges blanchissent et se fissurent (Osiru, 2008). Ces lésions ou chancres progressent lentement sur la tige, une fois celle-ci ceinturée la plante meurt. Des petites lésions brunes apparaissent ensuite entre les plus grandes lésions (figure 4 A). Les tissus sous les chancres présentent une pourriture sèche brune en particulier au niveau du xylème, celui-ci est décoloré d'une façon discontinue à brun et peut se développer dans les tissus adjacents au xylème primaire d'environ 4 à 7 mm au-dessus et en dessous des chancres (Grogan *et al.*, 1975).



Figure 4 : Lésions provoquées par *Alternaria tomatophila* et *A. alternata* ; **A.** sur tige, **B.** sur collet.

2.5.3. Sur fruits et tubercules

Le pathogène induit l'apparition de chancres sur fruit, en creux à l'aisselle du calice à partir de lésions sur sépales (Messiaen *et al.*, 1991). Une fois les fruits verts ou murs sont envahies, les tissus colonisés prennent progressivement une couleur noirâtre occasionnant de larges lésions circulaires concaves, parfois plissés en surface à la texture plutôt dure (figure 5). Un dense feutrage les recouvre à terme correspondant à la sporulation d'*Alternaria* (Blancard *et al.*, 2012). Selon Vloutoglou et Kalogerakis (2000) et Gani *et al.* (2013), l'alternariose de la pomme de terre est caractérisée par la présence de taches nécrotiques brunes sur les tubercules ou elles se développent sous forme de petites cavités noires. Sur fruit de tomate, une apparence d'anneaux concentriques à l'intérieur des lésions produites par *A. tomatophila* sont aussi observés (figure 5 A). Singh *et al.* (1987) ont rapporté que les taches sont de forme ovale à une forme angulaire mesurant jusqu'à de 0,3 à 0,4 cm de diamètre et le plus souvent avec une zone de chlorose autour de la lésion (figure 5).

Des travaux menés par Hathout *et al.* (1997) ont démontré que les tomates infectées par des champignons pathogènes, principalement *Alternaria spp.* ont un taux d'acides aminés aromatiques; γ -amino acide butyrique; tryptophane; la tyrosine et la phénylalanine plus élevé par rapport aux fruits sains.

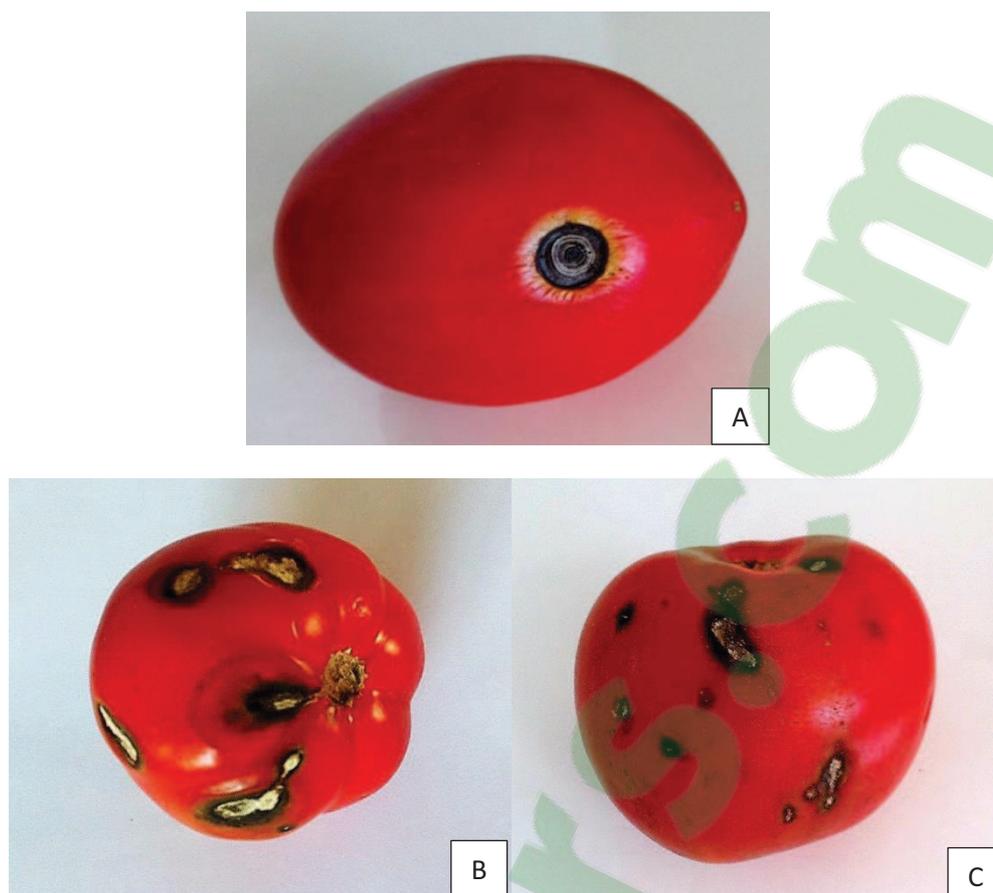


Figure 5 : Lésions sur fruits de tomates commercialisés provoquées par *Alternaria tomatophila* (A) et par *A. solani* (B), *A. arborescens* et *A. alternata* (C).

2.6. Fréquence et importance des dégâts

Parmi les maladies aériennes des *Solanacées*, l'alternariose est certainement l'une des plus fréquentes et des plus répandues dans le monde (Rotem, 1994 ; Pryor *et al.*, 2000 ; Song *et al.*, 2011), elle est retrouvée sur tous les continents, partout où ces plantes sont cultivées. On la retrouve sous de nombreux climats, en zones de production tropicales, subtropicales et tempérées (Deshwal, 2004). La présence de rosées dans les régions semi-arides permet son développement. Elle affecte surtout les cultures de plein champ, et parfois les abris froids. Elle est aussi très présente dans de nombreux jardins d'amateurs. Ses dégâts peuvent être conséquents si des conditions climatiques humides persistent et/ou si aucune méthode de protection n'est envisagée. Elle entraîne parfois des défoliations importantes à l'origine d'une réduction des rendements, mais aussi de nombreuses lésions sur fruits liées aux effets du soleil sur ces derniers qui sont moins protégés par le feuillage (Blancard *et al.*, 2012). Sur les cultures de *Solanacées*, ces champignons provoquent une perte de rendement, des dommages aux fruits et légumes et par conséquent une perte économique pour l'agriculteur (Snoussi, 2009). L'alternariose est une maladie très présente en Algérie ; elle affecte toutes les

productions de plein champ et sous les tunnels plastique (serre), les conséquences de la défoliation sont graves, elles contribuent au ralentissement et à la diminution de la production voir même la perte de fruits (ITCMI, 2010).

Dans une étude antérieure dont le but est de déterminer les éléments responsables de la pourriture des fruits de tomate, Ramgiry *et al.* (1997) ont constaté que la plus part des isolats obtenus à partir d'échantillons de tomates commercialisés comparés aux échantillons sur le terrain étaient des champignons. De plus, Datar et Mayee (1981) ont montré qu'*A. solani* pourrait attaquer les fruits de tomates avant et pendant leur maturité à travers des fissures de la croissance et d'autres blessures. Les espèces d'*Alternaria* ont été signalés à causer des maladies dans près de 400 espèces de plantes; *A. alternata* seul peut infecter plus de 100 espèces de plantes (Simmons, 1992 ; Rotem, 1994). De graves épidémies peuvent entraîner une défoliation complète et des pertes de récolte dans de courtes périodes de temps (Chaerani *et al.*, 2006). Les pertes de rendement allant jusqu'à 79% de dégâts entraînés par *A. solani* ont été signalés en provenance du Canada, de l'Inde, les États-Unis et le Niger (Basu, 1974 ; Datar et Mayee, 1981 ; Sherf et MacNab, 1986 ; Gwary et Nahunnaro, 1998 ; Grigolli *et al.*, 2011). Les infections au niveau du collet peuvent causer des pertes de semis de 20% à 40% dans le domaine cultivé (Sherf et MacNab, 1986).

2.7. Cycle infectieux

Le processus infectieux mis en place par les champignons du genre *Alternaria* pour infecter leur plante hôte peut se diviser en plusieurs stades : la conservation, la pénétration et l'invasion (protection vis-à-vis des défenses de l'hôte et production de facteurs nécrogènes), la sporulation puis la dissémination.

2.7.1. Conservation, sources d'inoculum

Alternaria peut se conserver durant plusieurs années à la surface des graines de tomate, dans le sol et sur les débris végétaux, grâce à son mycélium mélanisé et ses conidies (Sherf et MacNab, 1986 ; Linas *et al.*, 1998). Les chlamydospores peuvent également servir de structures de survie (Basu, 1974 ; Patterson, 1991). Par conséquent, le cycle de vie du pathogène comprend sol et des semences ainsi que les étapes atmosphériques, ce qui rend l'agent pathogène difficile à contrôler par des moyens de rotation et de l'assainissement. Dans certaines régions du monde, il serait aussi capable de se maintenir d'une saison à l'autre sur d'autres *Solanacées* comme la pomme de terre, l'aubergine, le poivron, la morelle noire

(*Solanum nigrum*), *S. carolinense*, *S. pseudocapsicum* (Neergaard, 1945 ; Ellis et Gibson, 1975 ; Blancard *et al.*, 2012).

2.7.2. Pénétration et invasion

Une fois que les spores entrent en contact avec les cellules végétales, leur germination peut se produire en 2 heures quand l'air est saturé en humidité à une large gamme de températures (de 8 ° à 32 °C) (Evans *et al.*, 1992). L'hydrophobicité de la cuticule est indispensable pour l'adhésion des conidies. Ces dernières germent et produisent un ou plusieurs tubes germinatifs en formant un mucilage fibreux de polysaccharides (mannose et rhamnose) ou de glycoprotéines qui permettent l'adhésion à la plante hôte (Hatzipapas *et al.*, 2002). La pénétration dans les tissus végétaux à travers les cellules de l'épiderme se fait directement à l'aide d'*appressoria* non mélanisées (Otani *et al.*, 1998 ; Cramer et Lawrence, 2003), qui entrent à travers les stomates ou blessures en fonction de la croissance fongique (Sherf et MacNab, 1986 ; Agrios, 2005) (Figure 7). La pénétration peut se produire à des températures entre 10 ° et 25 ° C (Sherf et MacNab, 1986). La stratégie de pénétration enzymatique chez les *Alternaria* est la plus évidente, la colonisation de l'hôte est facilitée par des enzymes (cellulases, la pectine galacturonase de méthyle). Le rôle crucial des lipases de type sérine estérase dans la dégradation de la cuticule semble clairement établi chez *A. brassicicola* (Berto *et al.*, 1997). L'addition d'anticorps anti-lipases, à une suspension de conidies, a pour effet de supprimer presque totalement l'apparition des symptômes (Berto *et al.*, 1999). Différentes cutinases induites, par la présence de monomères de cutines en surface du végétal, semblent également impliquées dans la pénétration du champignon dans sa plante hôte (Trail et Köller, 1993 ; Yao et Köller, 1995). *A. citri* semble dépendant de la présence d'endopolygalacturonases pour pénétrer son hôte, puisque le mutant déficient en cette enzyme est altéré dans sa capacité à établir une infection (Isshiki *et al.*, 2001). Ces métabolites dégradent la paroi cellulaire de l'hôte et par un certain nombre de toxines qui tuent les cellules de l'hôte et l'agent pathogène permettent de dériver des nutriments à partir des cellules mortes (Rotem, 1994). Le champignon envahit rapidement les tissus, les lésions deviennent visibles 2 à 3 jours après l'infection, et la production de spores se produit 3 à 5 jours plus tard (Sherf et MacNab, 1986 ; Blancard *et al.*, 2012).

2.7.3. Sporulation et dissémination

Pour se protéger des phytoalexines et phytoanticipines synthétisées par la plante hôte les espèces d'*Alternaria* mettent en place différents mécanismes de détoxification (enzymatique, par conjugaison, système d'efflux). *A. solani* possède des enzymes à activités tomatinase qui protègent de la tomatine (phytoanticipine), une saponine synthétisée par la tomate (Sandrock et vanetten, 1998). Sur les tissus colonisés, quand les conditions climatiques sont humides, *Alternaria* ne tarde pas à produire de courts conidiophores (figures 6 et 7). Les spores sont disséminées par le vent, mais aussi par la pluie et à la suite d'arrosages par aspersion. La présence d'eau est nécessaire pour que la sporulation ait lieu (Messiaen *et al.*, 1991). Les travailleurs, notamment *via* leurs outils, contribuent également à la dissémination de l'alternariose. Les conidies produites assurent des contaminations secondaires et par la suite plusieurs cycles parasites pourront avoir lieu dans la culture (Sherf et MacNab, 1986 ; Andersen et Frisvad, 2004 ; Leiminger *et al.*, 2010 ; Blancard *et al.*, 2012) (figure 6).

2.7.4. Conditions favorables à son développement

Cette alternariose est favorisée par des hygrométries élevées et des températures comprises entre 18°C et 30°C. Les rosées, de faibles précipitations continues (5 mm) ou des irrigations par aspersion suffisent à son extension, mais elles doivent être répétées pour que la maladie évolue rapidement. La plupart des travaux en aeromycology démontrent que le rapport des spores d'*Alternaria* dans des échantillons d'air dans les climats tempérés et humides, diffère de quelques-uns à plusieurs dizaines de pour cent (Rosas *et al.*, 1990 ; Mitakakis *et al.*, 1997 ; Sten-nett et Beggs , 2004 ; Maya- Manzano *et al.*, 2012). Les plantes stressées, mal fumées ou très chargées en fruits seraient plus sensibles. La maladie ne prend jamais un caractère explosif mais s'accroît progressivement avec le temps, au fur et à mesure du vieillissement des plantes, et devient grave en fin de saison (Blancard *et al.*, 2012).

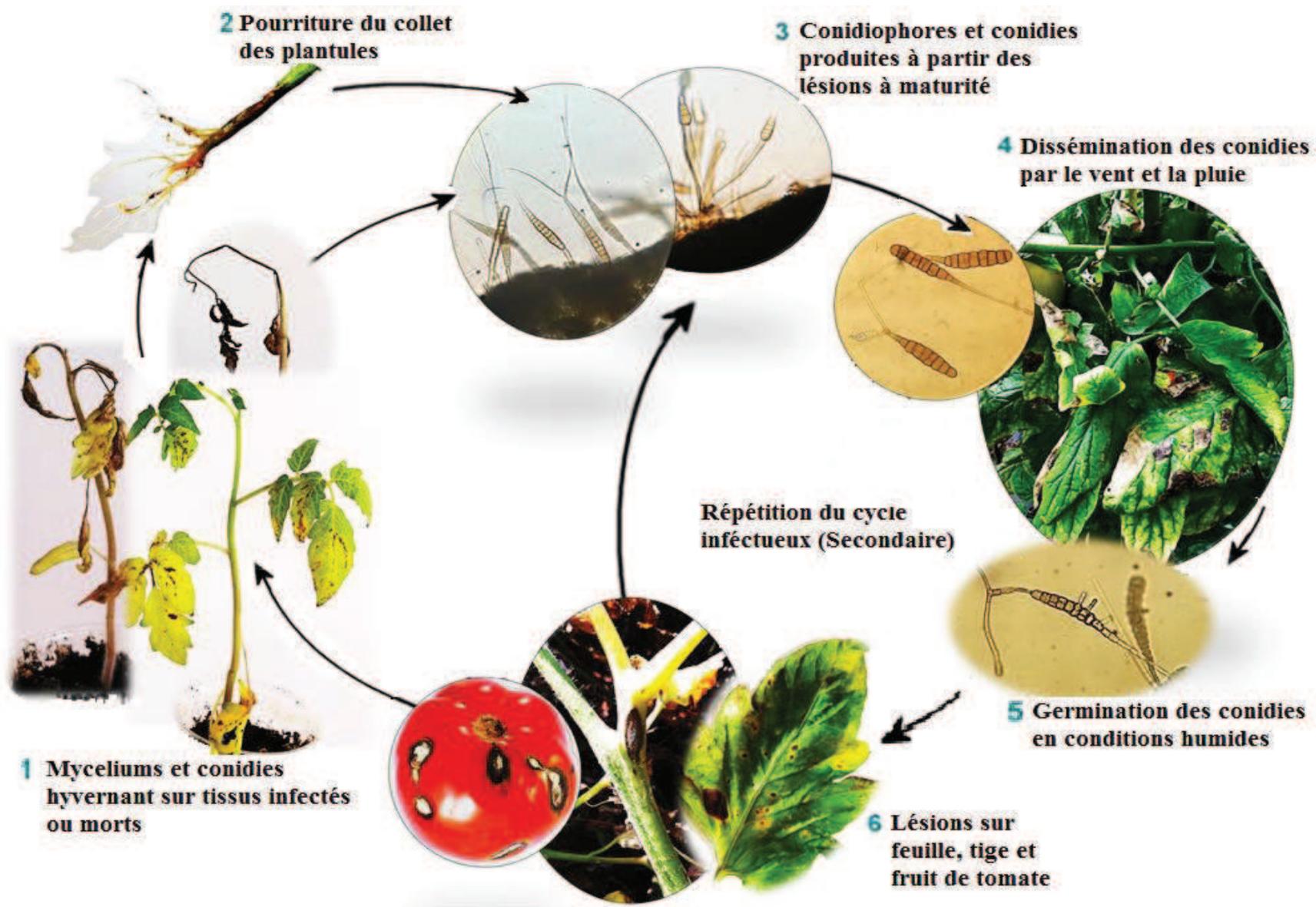


Figure 6 : Cycle infectieux de l'Alternariose

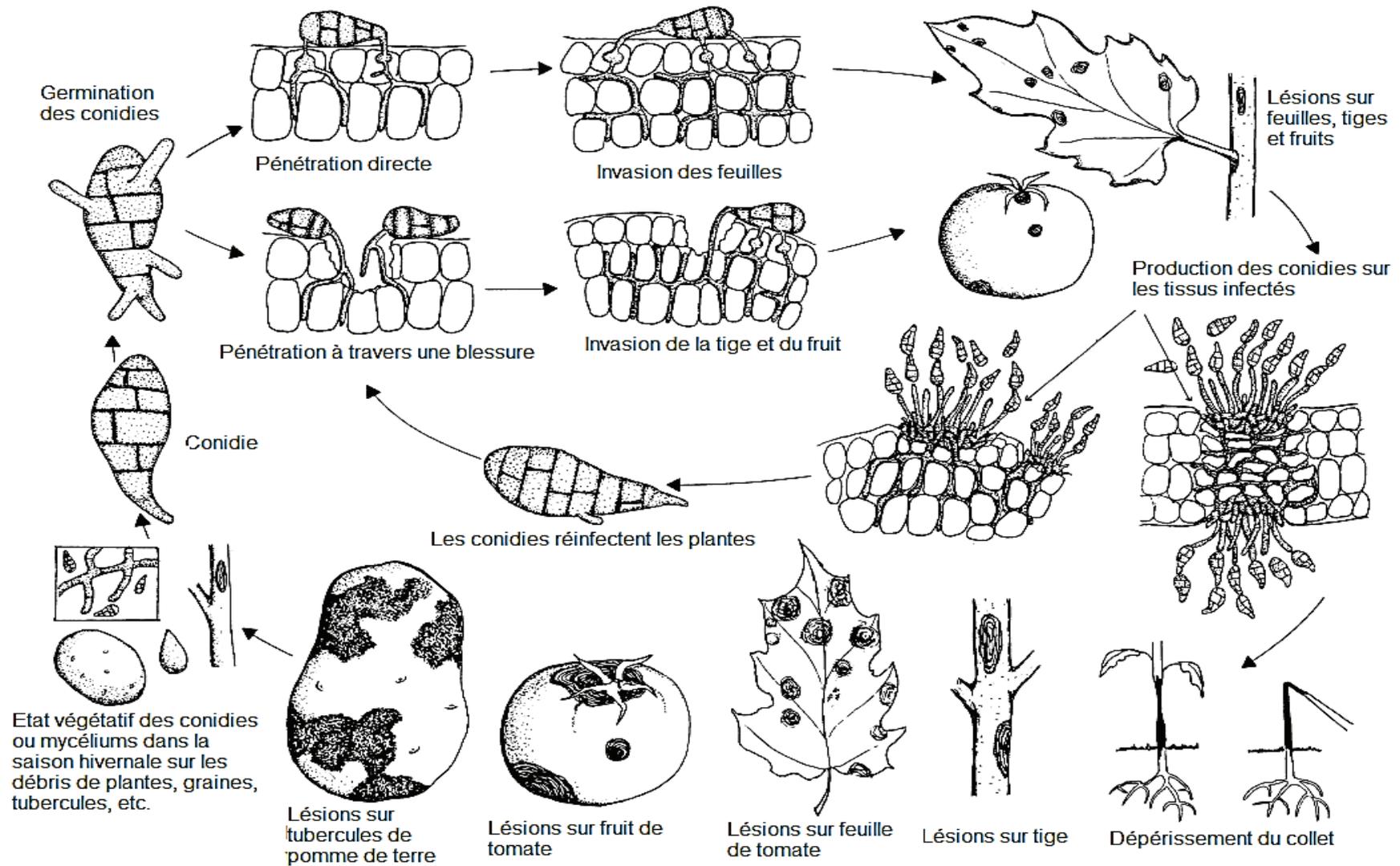


Figure 7 : Le processus d'infection, le développement et les symptômes des maladies causées par *Alternaria* pathogènes des *Solanacées* (Agrios, 2005 ; Chaerani et Voorrips, 2006).

2.8. Les différentes approches taxonomiques

La systématique des champignons est principalement basée sur l'observation des caractéristiques morphologiques propres à une espèce donnée. Lorsque les caractéristiques morphologiques sont inefficaces pour identifier un champignon (isolats sensibles aux conditions environnementales ou peu différenciés), on utilise les techniques physiologiques et biochimiques. Aussi les méthodes moléculaires et les méthodes chimiques ont été développées dans le but d'obtenir des données complémentaires à la description morphologique et/ou à la biologie moléculaire.

2.8.1. L'approche phénotypique

Bien que l'utilisation de la désignation du groupe d'espèce ne permet pas de résoudre définitivement les frontières entre espèces au sein d'*Alternaria*, les avantages de leur utilisation sont qu'ils organisent au niveau des sous-genres, un assemblage des espèces d'*Alternaria* morphologiquement différent et permettent une discussion généralisée des espèces morphologiquement semblables sans devenir trop limité, en raison de l'incertitude de leur nomenclature. En outre, le concept « groupe d'espèce » a fourni un cadre important pour la vérification d'hypothèses dans des études avancées sur la phylogénie des *Alternaria* (Andrew *et al.*, 2009). Simmons (1992) est passée de deux concepts d'Elliot et de Neergaard qui ont contribué à une organisation un peu vague du genre *Alternaria* en 14 groupes d'espèces en fonction des caractéristiques des conidies et leur catenulation.

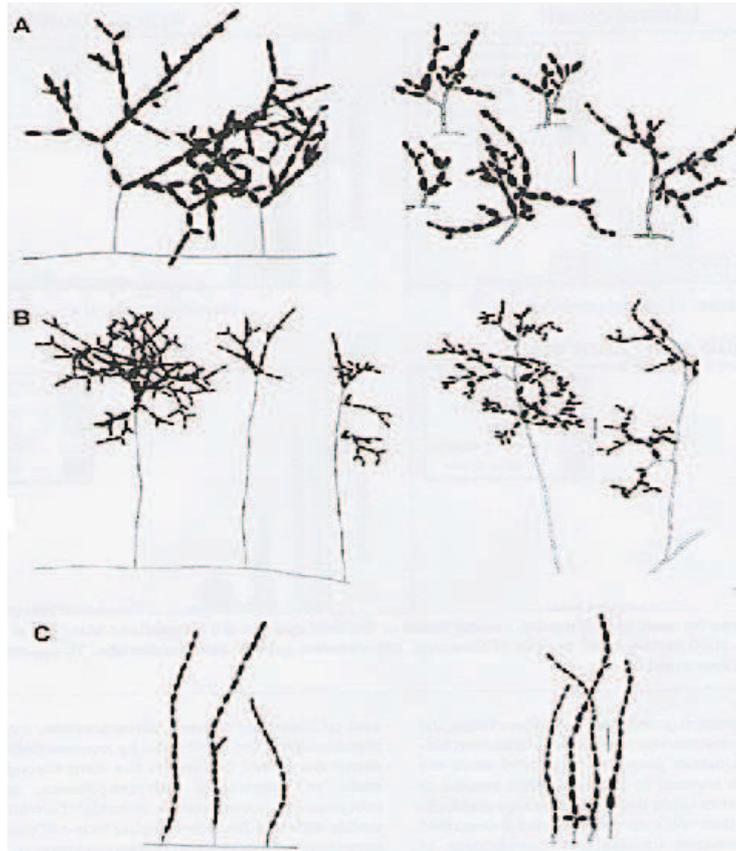


Figure 8 : Agencement des conidies de : **(A)** *A. alternata*, **(B)** *A. arborescens* et **(C)** *A. tenuissima* généré avec l'outil de modélisation élaboré par Taralova *et al.*, (2011) similaire aux descriptions menés par E.G. Simmons (2007) CBS fungal diversity : **A.** 582- 585, **B.** 654-657, **C.** 500-503.

Dans un travail ultérieur avec des isolats *Alternaria* provenant de poire, Simmons et Roberts (1993) ont avancé le concept « groupe d'espèces » en se référant à certains groupes distincts et en utilisant une espèce représentative (Simmons, 1993). Ils ont recueilli plus de 500 échantillons de poires en provenance du Japon, la Corée, la Chine Taiwan et Etats-Unis, l'obtention d'environ 200 souches d'*Alternaria* purifiées par les méthodes de culture monospores et une seule chaîne. Selon les modes de sporulation, les souches ont été séparés en six groupes: groupe 1 (groupe sans nom), le groupe 2 (groupe *A. gaisen*), le groupe 3 (groupe *A. arborescens*), groupe 4 (groupe *A. alternata*), un groupe 5 (groupe *A. tenuissima*) (figure 8), comprend au moins cinq taxons non décrits, avec des espèces telles qu'*A. tenuissima*, *A. rhadina* et *A. longipes* (Simmons, 1995 ; Roberts *et al.*, 2000) et le groupe 6 (groupe *A. infectoria*) (Simmons, 1993 et 1999 ; Simmons et Roberts, 1993). D'autres groupes d'espèces ont été discutés dans d'autres travaux comprenant *A. brassicicola*, *A. porri*, et les groupes *A. radicina* (Roberts *et al.*, 2000 ; Simmons, 1995 ; Pryor et Gilbertson, 2002). Plus

récemment, basé sur des études phylogénétiques, le genre *Alternaria* a été séparé en 24 sections (Woudenberg *et al.*, 2013 ; Lawrence *et al.*, 2013), chez les espèces *Alternaria* à petites spores, la section *alternata* comprend près de 60 espèces, la section *porri* comprend près de 80 espèces et représente la plus grande section *Alternaria* (Lawrence *et al.*, 2013).

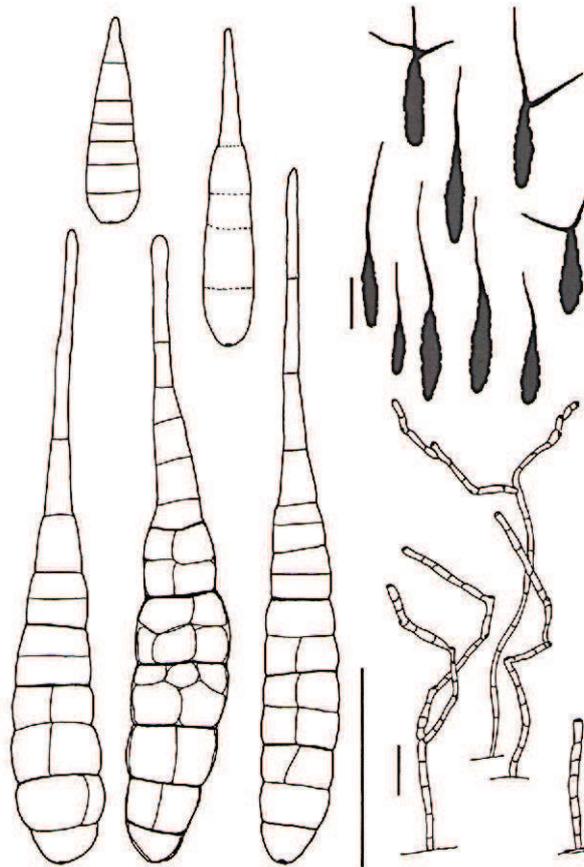


Figure 9 : Conidies et conidiophores de la souche *A. solani* représentative E.G.S. 44 098 (Simmons, 2007) CBS fungal diversity, 185- 187. Bar= 50µm.

Alternaria solani appartient au groupe d'espèces à grosses spores (section *porri*) au sein du genre *Alternaria*, caractérisé par les conidies solitaires (figure 9), supportées individuellement ou rarement en chaîne de deux sur des conidiophores simples et séptés (Neergaard, 1945). Les conidies d'*A. solani* sont muriformes et à bec filamenteux (Neergaard, 1945 ; Ellis et Gibson, 1975), elles mesurent entre 150 et 200 µm de long (de la base à l'extrémité du bec) cette espèce est en général identifiable comme l'agent pathogène lié à la brûlure foliaire de pommes de terre (Simmons, 2007).

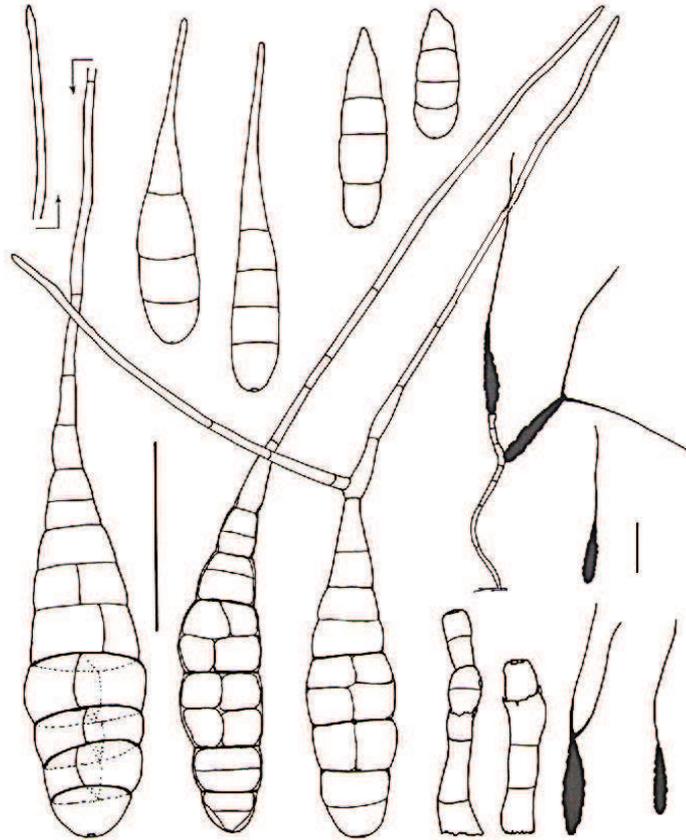


Figure 10 : Conidies et conidiophores de la souche *A. tomatophila* représentative E.G.S. 42 165 (Simmons, 2007) CBS fungal diversity, 203- 205. Bar= 50µm.

Alternaria tomatophila (E.G Simmons, 2000) tout comme *A. solani*, appartient aux espèces à grosses spores (section *porri*), elle dispose d'un mycélium cloisonné se mélanisant progressivement avec l'âge, elle produit de courts conidiophores bruns sur lesquels ne se forme souvent qu'une seule conidie. Les conidies sont brunes, pluricellulaires et très allongées. Elles possèdent un long appendice hyalin (bec) (figure10), parfois bifurqué et plus long que le corps de la spore, qui mesurent entre 120 et 300 µm de long.

Depuis de nombreuses années la taxonomie des espèces d'*Alternaria* associés aux maladies de la tomate et de la pomme de terre n'ont pas réussi à faire la distinction entre *A. solani* sur pomme de terre et *A. tomatophila* sur tomate. En particulier Rotem (1994) et d'autres auteurs anciens (Ellis, 1971) ont publié beaucoup de travaux sur la sporulation d'*A. solani* en culture. *A. tomatophila* est le pathogène le plus commun lié à la brûlure foliaire de la tomate. À l'inverse, entre le nombre des isolats d'*Alternaria* à grosses spores examinés sur lésions de

tomates, aucune n'est identifiable comme l'agent pathogène lié à la brûlure foliaire des pommes de terre (Simmons, 2007).

2.8.2. Culture sur milieux classiques

La détection des pathogènes des plantes est effectuée en générale par des méthodes classiques. L'isolement ainsi que l'étude des caractères culturaux sont réalisés le plus souvent sur des milieux solides tels que le milieu peptone glucose de Sabouraud (Dongyou, 2010), le milieu synthétique Czapek dox agar (Salam *et al.* 2006), ou encore sur milieu au Malt agar (Messiaen *et al.*, 1991), ils permettent aisément la croissance de bon nombre de champignons, mais sont loin de constituer les meilleurs milieux pour la sporulation de certaines espèces pathogènes d'*Alternaria*. Il est donc nécessaire de procéder à des subcultures sur milieux pauvres tel que l'eau gélosée (agar 2%) (Rotem, 1994). Il existe aussi des milieux plus spécifiques, les milieux à base de décoctions végétales telles que les extraits de feuilles d'hôte pour certaines espèces phytopathogènes (Kozlovski et Kvasnyuk, 1984) ou un milieu à base de pomme de terre (PSA) (Tong *et al.*, 1994 ; Samson *et al.* 2002) ou encore les milieux pomme de terre- carotte agar (PCA) et V8 (Simmons, 2007), se sont révélés favorables à la sporulation. Des versions non gélosées de certains de ces milieux sont utilisés pour les cultures liquides (Guiraud, 2003 ; Tatiana *et al.*, 2010).

2.8.3. L'approche moléculaire

Les techniques moléculaires ont connu un progrès important et ont suscité un intérêt énorme grâce à l'émergence de la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Lorsque les caractéristiques morphologiques sont insuffisantes pour identifier un champignon, on utilise les techniques physiologiques et biochimiques. Cependant, pour des champignons filamenteux peu différenciés tels qu'*Alternaria*, ces méthodes sont laborieuses, longues et quelquefois incomplètes (Andersen et Thrane, 1996 ; Frisvad *et al.*, 1998 ; Guarro *et al.*, 1999).

3.8.3.1. Outils moléculaires modernes et taxonomie

Depuis quelques années, le développement des méthodes analytiques et moléculaires a permis aux scientifiques de réaliser une classification des microorganismes selon des caractéristiques biochimiques basées sur l'étude de trois grandes classes principales de molécules :

– les métabolites primaires, composés nécessaires aux fonctions vitales de l'organisme ;

- les métabolites secondaires tels que les alcaloïdes ou les terpènes, qui n'ont pas de fonctions vitales ;
- les sémantides qui portent l'information génétique : acide désoxyribonucléique (ADN), acide ribonucléique (ARN) et protéines (Verscheure *et al.*, 2002).

La chimiotaxonomie, partie intégrante de la démarche, comprend les méthodes moléculaires et les méthodes chimiques. Anderson et Thrane (1996) ont utilisé à la fois la morphologie, le profil en métabolites et les caractéristiques de culture pour classer 36 isolats appartenant aux espèces d'*A. infectoria* et *A. alternata*. L'analyse par groupements des résultats obtenus a permis de délimiter deux groupes : le groupe *infectoria* dont les isolats produisaient uniquement des composés non identifiés et le groupe *alternata*. D'autres travaux menés par Andersen *et al.* (2008) avait pour but de décrire la méthodologie avec profilage métabolique en utilisant la chimiotaxonomie, cette méthode a permis la distinction entre les espèces *A. dauci*, *A. porri*, *A. solani*, et *A. tomatophila*, avec leurs métabolites spécifiques respectifs.

3.8.3.2. Etude de la variabilité interspécifique

Les méthodes moléculaires sont universellement applicables et permettent d'explorer le polymorphisme à différents niveaux (comparaison entre des souches, des espèces, des genres, etc.). Les méthodes moléculaires sont basées sur l'étude d'un gène (locus), d'un fragment d'ADN défini (espaceur, intron, etc.), de plusieurs gènes (multiloci) ou encore de l'ADN total, dépendant du but poursuivi (Verscheure *et al.*, 2002).

Les méthodes basées sur l'étude d'un gène ou de plusieurs gènes utilisent la technique PCR (Mullis *et al.*, 1986). Cette technique permet l'amplification de séquences spécifiques d'ADN *via* sa synthèse *in vitro* et l'obtention rapide et simple de microgrammes de l'ADN ciblé. L'analyse de l'ADN ribosomique (ADNr) par séquençage est devenu un outil moderne et commun en systématique, en particulier les régions variables de l'espaceur interne transcrit (ITS) sont couramment utilisés pour étudier les relations phylogénétiques entre les espèces *Alternaria* qui a révélé une variation entre les espèces à petites et à grosses spores (Kusaba et Tsuge, 1994 et 1995 ; Pryor & Gilbertson, 2000 ; Pryor & Michailides, 2002 ; Wang *et al.*, 2001).

La PCR-RFLP (polymorphisme de taille des fragments de restriction) (digestion de l'ADN par des enzymes de restriction) et le séquençage précédé d'une PCR sont basés sur l'étude d'un gène ou d'un fragment d'ADN (Frisvad *et al.*, 1998 ; Kano *et al.*, 2000). Plusieurs

auteurs ont utilisé un fragment de l'ADN ribosomal tel que les unités 5.8S (très conservées), 18S et 25S (très conservées mais plus utiles que les 5.8S), les espaceurs (interne ou externe qui sont des régions non codantes et variables) (Lübeck *et al.*, 2000 ; Makimura *et al.*, 2001) ou encore l'intergenic spacer (IGS) qui sépare deux copies de l'ADN ribosomal. L'analyse de basse fréquence des fragments de restriction (LFRFA), polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), et l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) ont tous été utilisés pour fournir une indication de parenté entre les souches (Schaechter, 2009). Des études génétiques utilisant des isozymes, des marqueurs RFLP ou AFLP montrent une forte variabilité génétique intraspécifique parmi des isolats de différentes espèces, notamment *A. alternata*, *A. solani* ou *A. tomatophila* (Petrunak et Christ, 1992 ; Weir *et al.*, 1998 ; Aradhya *et al.*, 2001 ; Oviedo *et al.*, 2013 ; Gannibal *et al.*, 2014).

À côté de l'étude d'un gène, les techniques de "fingerprints" (empreintes moléculaires) ciblent l'ensemble du génome. Ces techniques contiennent, entre autres, le polymorphisme de l'ADN amplifié au hasard (RAPD), les microsatellites et les minisatellites. Le RAPD (Arisan-Atac, Kubicek, 1995 ; Frisvad *et al.*, 1998) utilise la technique PCR pour amplifier des segments d'ADN génomique avec des amorces d'oligonucléotides non spécifiques. Cette technique présente le désavantage d'être peu reproductible et nécessite la standardisation de la méthode d'amplification ainsi que de la visualisation des fragments obtenus. Au sein de l'espèce *A. alternata*, plusieurs études mettent en évidence des variabilités entre des souches pourtant représentant le même pathotype. Ainsi, Morris *et al.* (2000) signalent à l'aide de la RAPD, une variabilité génétique importante au sein de populations d'*A. alternata* f. sp. *Lycopersici* (syn. *A. arborescens*) qui reflète une variabilité morphologique considérable de ces isolats. Cependant, elle peut être utile lors de l'analyse rapide d'un nombre élevé d'isolats dont on suspecte qu'ils font partie du même taxon et dont aucune information sur la séquence d'un marqueur n'est connue, ce type de marqueur a été utile pour étudier les variations intraspécifiques et interspécifiques dans le genre *Alternaria* (Cooke *et al.*, 1998 ; Weir *et al.*, 1998 ; Roberts *et al.*, 2000).

Les microsatellites (séquences répétitives de 2 à 5 paires de bases réparties de manière aléatoire dans le génome) et les minisatellites (séquences répétitives d'environ 20 paires de bases) peuvent être amplifiés (Frisvad *et al.*, 1998). Ces techniques utilisant les micro- et minisatellites sont reproductibles et nécessitent peu d'ADN mais sont longues et coûteuses. Benichou *et al.* (2009) ont évalué la variabilité allélique au sein de 43 isolats d'*A. dauci* à partir de 11 marqueurs microsatellites polymorphes isolés à partir du pathogène sur la base

des banques génomiques enrichies. Les essais d'amplification et le séquençage des amplicons obtenus ont montré que certains de ces microsatellites pourraient être utilisés sur différentes espèces telles qu'*A. solani*, *A. bataticola* et *A. zinniae*.

2.8.3.3. Immunotaxonomie et électrophorèse des protéines

Les champignons produisent un grand nombre d'antigènes qui se sont révélés être propres au genre et/ou à l'espèce. En effet, des études ont montré que non seulement la présence de polysaccharides (exoantigènes) permet de classer les espèces, mais aussi que la composition en carbohydrates définit le taxon auquel appartient l'espèce étudiée. De plus, la production de ces molécules ne dépend ni du milieu de culture, ni de la température, ni de l'âge de la culture (Frisvad *et al.*, 1998). À côté des méthodes immunologiques, l'électrophorèse des protéines et des isozymes (enzymes différents mais qui catalysent la même réaction) est une technique largement utilisée en taxonomie. L'électrophorèse des isozymes permet de détecter et d'identifier un champignon particulier mais son utilisation est encore controversée bien que des études aient utilisé la différence des profils en isozymes pour résoudre des problèmes situés au niveau de l'espèce (Micales, 1986). Des chevauchements importants surviennent lorsque les espèces sont très proches (Petrunak et Christ, 1992). En plus, cette technique repose sur l'expression de gènes qui sont affectés par les méthodes culturales du champignon causant ainsi des erreurs d'identification.

2.8.3.4. Méthodes chimiques

Les méthodes chromatographiques et spectroscopiques permettent l'analyse qualitative et quantitative d'un ou plusieurs métabolites ou composés de la membrane cellulaire. On étudie principalement les polysaccharides, les lipides insaponifiables, les acides gras, les métabolites secondaires volatils et non volatils (Verscheure *et al.* 2002). Un exemple de travaux tel que celui de Xiufen *et al.* (2009) sur une glycoprotéine, purifiée par chromatographie d'échange d'anions à partir du mycélium d'*A. tenuissima*, responsable de l'induction de la résistance chez la plante de tabac contre le virus de la mosaïque du tabac pour la mise au point d'une lutte biologique. Certaines espèces d'*Alternaria* produisent des toxines, leurs mise en évidence ou de doser par des méthodes chimiques, leurs recherche nécessite une extraction et une purification. La caractérisation s'effectue par chromatographie en couche mince sur plaque de gel silice (Guiraud, 2003). Plus de 30 produits potentiellement toxiques ont été isolés et caractérisés à partir d'espèces d'*Alternaria* qui produisent de nombreux métabolites secondaires tels que les phytotoxines spécifiques ou non spécifiques à l'hôte, qui jouent un

rôle important dans la pathogenèse de plantes (Templeton *et al.*, 1967 ; Pero et Main, 1969 ; Tirokata *et al.*, 1969 ; Coombe *et al.*, 1970 ; Pero *et al.*, 1973 ; Ueno *et al.*, 1975 ; Janardhanan et Husein, 1975 ; Maekawa *et al.*, 1984 ; Rizk *et al.*, 1985 ; Tadakazu *et al.*, 1985 ; Liebermann *et al.*, 1988 ; Visconti *et al.*, 1988 ; Logrieco *et al.*, 1990 ; Thomma, 2003).

En conclusion, lors d'études taxonomiques, les caractéristiques morphologiques seront toujours étudiées mais seront combinées avec les études moléculaires et chimiques pour identifier et classer correctement un champignon.

2.9. Les *Alternaria* producteurs de mycotoxines

Les champignons du genre *Alternaria* appartiennent à la catégorie des nécrotrophes, ils tuent les cellules végétales, notamment par l'action de toxines (Agrios, 2005), leur pouvoir pathogène et leur virulence tient en compte la nature des deux organismes, hôte- parasite, implique à la fois la notion d'aptitude parasitaire et celle de réceptivité (Joly, 1964). Bien que *A. alternata* a été considéré comme l'espèce principal productrice de mycotoxines, les autres membres du genre, tels que *A. citri*, *A. solani*, *A. longipes* et *A. tenuissima* et *A. arborescens* espèces *infectoria* groupes, sont également capables de produire ces contaminants toxiques dans leurs hôtes (Barkai-Golan, 2008). Ces champignons, considérés comme polluants biologiques, par leur productions d'allergènes, antigènes dans l'organisme, capables de déclencher une réponse immune circulant de type immunoglobuline (E ou IgE), qui se manifeste par une réponse allergique avec libération de médiateurs, tel que l'histamine chez le sujet sensibilisé (Botta *et al.*, 2005). Plusieurs travaux sur les toxines *Alternaria* ont été publiées au cours des dernières décennies (Visconti et Sibilgia, 1994 ; Panigrahi, 1997 ; Bottalico et Logrieco, 1998 ; Scott, 2001 et 2004). *A. alternata* produit un certain nombre de mycotoxines à savoir l'alternariol (AOH), alternariol monométhyle éther (AME), altertoxine (ATX-I,-II,-III) et l'acide tenuazonique (TeA), altenuene (ALT) et iso-altenuene (iso-ALT), c'est donc une espèce d'intérêt particulier pour les mycotoxicologistes (Visconti *et al.*, 1988 ; Logrieco *et al.*, 1990 ; Andersen et Thrane, 1996 ; Ostry, 2008). Le pathotype *A. alternata* f. sp. *lycopersici* produit les toxines AAL. Ces toxines AAL sont structurellement liées aux fumonisines. Il n'y a eu qu'un seul rapport sur leur présence naturelle dans l'ensilage de foin (Yu *et al.*, 1999). La toxicité de l'AAL-toxine vis-à-vis des bovins laitiers n'est pas connue, mais devrait être examinée compte tenu de l'apparente abondance de ces toxines. A

l'exception d'*A. alternata*, beaucoup d'espèces sont capables de synthétiser d'importantes mycotoxines mentionnées dans le tableau (5).

Tableau 5: La production de mycotoxines par différentes espèces *Alternaria* à l'exception d'*A. alternata*.

Espèces	Mycotoxines	Référence
<i>A. brassicae</i> (Berk.) Sacc.	AOH, AME	Bottalico et Logrieco (1998)
<i>A. capsici-amui</i> Săvul. & Sandu	AOH, AME, TeA	Bottalico et Logrieco (1998)
<i>A. cassiae</i> Jurair & A. Khan	ATX-I, -II	Hradil <i>et al.</i> (1989)
<i>A. citri</i> Ell. & Pierce	AOH, AME, TeA	Freeman (1965) ; Kinoshita <i>et al.</i> (1972)
<i>A. cucumerina</i> (Ell. & Ev.) Elliott	AOH, AME	Raistrick <i>et al.</i> (1953) ; Freeman (1965)
<i>A. dauci</i> (Kühn) Groves & Skolko	AOH, AME	Freeman (1965) ; Raistrick <i>et al.</i> (1953)
<i>A. japonica</i> Yoshii	TeA	Kinoshita <i>et al.</i> (1972)
<i>A. kikuchiana</i> Tanaka	AOH, AME, TeA	Tirokata <i>et al.</i> (1969) ; Kinoshita <i>et al.</i> (1972) ; Kameda <i>et al.</i> (1973)
<i>A. longipes</i> (Ell. & Ev.)	AME, TeA	Mikami <i>et al.</i> (1971) ; Bottalico et Logrieco (1998)
<i>A. mali</i> Roberts	ATX-I, -II, -III, TeA	Kinoshita <i>et al.</i> (1972)
<i>A. oryzae</i> Hara	TeA	Kinoshita <i>et al.</i> (1972)
<i>A. porri</i> (Ell.) Cif.	AME, TeA	Bottalico et Logrieco (1998)
<i>A. radicina</i> Meier, Drechsler & Eddy	ATX-I, -II, -III, TeA	Bottalico et Logrieco (1998) ; Solfrizzo <i>et al.</i> (2005)
<i>A. solani</i> Sorauer	AOH, AME, TeA	Stoessl (1969) ; Pollock <i>et al.</i> (1982) ; Bottalico et Logrieco (1998)
<i>A. tenuissima</i> (Kunze) Wiltshire	AOH, AME, ATX-I, -III, TeA	Young <i>et al.</i> (1980) ; Bottalico et Logrieco (1998)
<i>A. tomato</i> (Cooke) Jones	AOH, AME, ATX-I, -II, -III, TeA	Bottalico et Logrieco (1998)
<i>A. tomatophila</i> (Simmons)	ATX-I, altersolanol A, macrosporin	Andersen <i>et al.</i> (2008)

3. Méthodes de lutte contre *Alternaria*

L'alternariose des *Solanacées* réduit considérablement le rendement à la fois qualitativement et quantitativement. Afin de contrôler efficacement cette maladie, plusieurs procédés sont utilisés.

3.1. Pratiques culturales

Les bonnes pratiques culturales contribuent à minimiser l'incidence et la propagation de la maladie de la brûlure foliaire, elles comprennent l'utilisation de semences propres et la rotation des cultures assez longues, de l'ordre de 3 à 4 années, faisant intervenir des céréales à petits grains comme le maïs, qui sont souvent envisagées dans les parcelles fortement affectées. Il convient aussi d'éliminer complètement les débris de plantes à la fin de la saison de récolte pouvant servir d'hôtes intermédiaires (Blancard *et al.*, 2012). Gomez-Rodriguez *et al.* (2003, 2007) ont trouvé que la culture intercalaire de tomate avec le tagète érigée (*Tagetes erecta L.*) a induit une réduction significative de la brûlure foliaire et dégâts sur fruits causée par *A. solani*. Ceci a été réalisé au moyen de trois mécanismes différents ; (i) l'effet allélopathique du tagète érigée sur la germination des conidies d'*A. solani*, (ii) en réduisant la période avec une humidité relative $\geq 92\%$, diminuant ainsi le développement des conidies (iii) en fournissant une barrière physique contre la propagation de la conidies. En outre, l'augmentation de l'espacement entre les plantes permet d'améliorer la circulation d'air et favoriser le séchage des plantes doit aider à éliminer l'excès d'humidité. La fertilité semble aussi jouer un rôle dans la gestion de la maladie, puisque les plantes bien drainées semblent être plus résistantes à la maladie. Il est connu, par exemple qu'un sol peu drainé en azote ou une carence de ce dernier augmente la sensibilité des cultures de *Solanacées* à *A. solani* (Nasraoui, 2006). Sachant aussi, les différentes techniques d'irrigation agissent directement sur la survie et la dispersion de l'inoculum au sein des cultures, elle varie selon la technique appliquée (déversement, irrigation à la raie, irrigation au goutte à goutte, aspersion). Une bonne gestion de celle-ci constitue un moyen de lutte efficace contre *Alternaria* qui persiste dans les débris sec de pomme de terre et de tomate et qui produit ses spores la nuit, si les journées sont humides et la rosée nocturne est abondante, l'aspersion n'accroît pas l'infection. Par contre une rosée nocturne abondante alterne avec une sècheresse diurne, l'aspersion faite pendant le jour accroît fortement l'infection (Lepoivre, 2003).

3.2. La lutte génétique

Des sources de résistance ont été trouvées chez plusieurs espèces sauvages, en particulier *Lycopersicon hirsutum* et *L. pimpinellifolium*. Elles ont été utilisées dans des programmes d'amélioration qui ont permis d'obtenir des lignées et des cultivars disposant d'une résistance polygénique partielle à l'alternariose, ayant aussi une maturité assez tardive. Une diminution de la sensibilité de la tige et du collet à l'alternariose a été rapportée chez d'autres espèces sauvages sans être exploitées efficacement (Chaerani et Voorrips, 2006). Dans certains contextes culturels en Inde, un certain nombre de variétés de tomate ('Ace', 'Flora-Dade'...) se sont montrées moins sensibles à cette maladie (Blancard *et al.*, 2012).

Divers études génétiques publiées sur la résistance aux symptômes liés à l'alternariose, ont montré une diminution des dégâts et des symptômes liés à la maladie (tableau 6). Cette diminution étant limitée par l'absence de gènes de résistance efficaces chez la tomate cultivée (Vakalounakis, 1983 ; Poysa et Tu, 1996 ; Banerjee *et al.*, 1998 ; Vloutoglou *et al.*, 2000) et par l'expression quantitative et polygénique de la résistance (Barksdale et Stoner, 1977 ; Maiero *et al.*, 1989 ; Nash et Gardner, 1988 ; Maiero *et al.*, 1990 ; Thirthamallappa et Lohithaswa, 2000). Des sources de résistance à l'alternariose ont été identifiées chez les parents sauvages de la tomate. Certains d'entre eux ont été utilisés par des approches traditionnelles de reproduction, mais une augmentation du niveau de résistance s'est avéré en corrélation négative avec la précocité (Nash et Gardner, 1988 ; Maiero *et al.*, 1989 ; Foolad et Lin, 2001 ; Foolad *et al.*, 2002) et le rendement (Barrat et Richards, 1944). Les lignées les plus résistantes et les cultivars hybrides ayant des caractéristiques horticoles acceptables, qui sont actuellement disponibles, ont une résistance modérée à l'alternariose et viennent à échéance un peu plus tard (Gardner, 1988 ; Gardner et Shoemaker, 1999 ; Gardner, 2000). Par conséquent, des cultivars résistants avec de meilleures caractéristiques horticoles sont encore nécessaires.

Tableau 6 : Études génétiques classiques de la résistance à l'alternariose engendrant la brûlure foliaire, dépérissement du collet, et de la lésion des tiges de la tomate (Chaerani et Voorrips, 2006).

Parent résistant ^a		Type de population	Contrôle génétique	Référence
Brûlure foliaire	<i>Solanum lycopersicum</i> 71B2	F1	polygénique récessif	Maiero <i>et al.</i> (1989)
	<i>Solanum lycopersicum</i> C1943	F1	polygénique récessif	Maiero <i>et al.</i> (1989)
	<i>Solanum lycopersicum</i> C1943	F1, F2, BC1, BC2	polygénique récessif avec effets additifs, dominants (dom × dom) et épistatiques	Maiero <i>et al.</i> (1990)
	<i>Solanum lycopersicum</i> NCEBR-1	F1, F2, BC1, BC2	Au moins 3 gènes avec des effets additifs, dominants ou épistatiques (add × add, add × dom, dom × dom)	Nash et Gardner (1988)
	<i>Solanum lycopersicum</i> NCEBR-2	F1	Polygénique, dominance partielle	Maiero <i>et al.</i> (1990)
	<i>Solanum lycopersicum</i> 87B187	F1	Polygénique, dominance partielle	Maiero <i>et al.</i> (1990)
	<i>Solanum lycopersicum</i> 83602029	F1, F2, BC1, BC2	Quantitatives, Gènes dominants avec des effets additifs, dominants et épistatiques	Stancheva (1991)
	IHR 1816 (= <i>Solanum lycopersicum</i> NCEBR-1)	F1, F2, BC1, BC2	polygénique récessif avec des effets additifs et épistatiques (add × dom) au stade de plantule, avec des effets un additifs, la dominants et épistatiques (add × add) au stade adulte	Thirthamallappa et Lohithaswa (2000)
	IHR 1939 (= <i>Solanum pimpinellifolium</i> L4394)	F1, F2, BC1, BC2	polygénique récessif avec des effets additifs et épistatiques (add × dom) au stade de plantule, avec des effets un additifs, la dominants et épistatiques (add × add) au stade adulte	Thirthamallappa et Lohithaswa (2000)
	<i>Solanum lycopersicum</i> NC39E	F2, F3	Polygénique, dominance partielle	Foolad <i>et al.</i> (2002)
Lésion sur tige	<i>Solanum lycopersicum</i> C1943, NCEBR-2	F1, F2, BC1, BC2	polygénique récessif avec additif et dominant	Maiero <i>et al.</i> (1990)
Dépérissement du collet	<i>Solanum lycopersicum</i> 83602029	F1, F2, BC1, BC2	polygénique récessif avec des effets additifs, dominants et épistatiques	Stancheva (1991)

^a Nouvelle nomenclature selon Peralta *et al.* (2005).

3.3. Extraits de plantes

L'utilisation des extraits de plantes et produits naturels est très encouragée, car ces produits sont sans danger pour la santé et ne causent pas de pollution (Mamgain *et al.*, 2013). Plusieurs travaux au laboratoire menés sur différents tissus végétaux, tels que les racines, les feuilles, les graines et les fleurs ont démontré que les extraits de plantes possèdent des propriétés inhibitrices contre les bactéries, les champignons et les insectes (Davicino *et al.*, 2007). Ces produits non conventionnels ont été testés avec plus ou moins de succès afin d'induire chez la tomate une résistance, notamment à l'alternariose. Dans le même registre, divers extraits de plantes, des huiles végétales (*Acacia concinna*, *Bassia latifolia* [syn. *Madhuca longifolia* var. '*latifolia*'], ail, *Azadirachta indica*...) permettraient de limiter le développement de ce parasite (Blancard *et al.*, 2012).

Quelques études de cas menés par Dellavalle *et al.* (2011) sur des espèces végétales criblées *in vitro* pour leur activité antifongique contre *Alternaria spp.* pour l'évaluation antifongique avec des tests microspectro-photométriques. La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration fongicide minimale (MFC) de 29 extraits ont été évalués, 31% des extraits ont inhibé la croissance, semblable aux effets d'un fongicide chimique contre *Alternaria spp.* Les valeurs de CMI des extraits ont été comprises entre 1,25 et 25 pg ml^{-1} . Les valeurs MFC des extraits variaient entre 1,25 pg ml^{-1} avec *Rosmarinus officinalis L.* et 10 pg ml^{-1} avec *Cynara scolymus L.* Les valeurs de CMI et MFC obtenues à partir de feuilles de *Salvia officinalis L.* et *R. officinalis*, et des extraits de graines de *Salvia sclarea L.* étaient tout à fait comparables aux valeurs obtenues avec le fongicide Captane classique (2,5 ug mL^{-1}). Les extraits de *Salvia sclarea*, *S. officinalis* et *R. officinalis* pourraient être considérés comme des sources potentielles de composés antifongiques pour le traitement des maladies des plantes. Ces extraits ont montré une activité maximale, même à des concentrations très faibles avec les mêmes effets fongicides qu'un fongicide chimique.

Aussi, les travaux de Nikumbh et Saler (2011) qui consistaient à tester l'effet des extraits de plantes sur le pathogène de l'oignon *A. alternata*, notamment l'extrait de feuilles d'*Annona squamosa*, qui a inhibé la croissance du champignon de 91,13% et 68,35% à concentrations de 50% et 100%, respectivement tandis que les extraits de *Withania somnifera L.* ont inhibé de 54,09% et 36,60% par rapport aux autres extraits de plantes, le mélange de trois extraits de plantes (Cassia, Argémone, Parthenium) a donné de meilleurs résultats par rapport aux extraits de plantes testés individuellement.

En conclusion, les extraits de plantes présentent des propriétés fongicides étonnantes qui soutiennent leur utilisation traditionnelle comme antiseptiques.

3.4. La lutte biologique

L'essor de la lutte biologique a longtemps été freiné par la position dominante de la lutte chimique dans les systèmes de productions intensifs. Elle vise à contrôler les agents pathogènes aux moyens d'agents de lutte biologique (Biological contrôle agent : BCA) ainsi que les produits qu'ils en dérivent (Lepoivre, 2003). Plusieurs antagonistes potentiels sont signalés dans la littérature : des bactéries (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus spp.*, etc.) comme des champignons (*Trichoderma polysporum*, *Chaetomium globosum...*); leurs performances ne semblent toutefois pas importantes en situation d'épidémie naturelle (Blancard *et al.*, 2012).

Quelques études de cas sur *Trichoderma spp.* connu depuis longtemps (Bisby, 1939), est utilisé comme agent de lutte contre les phytopathogènes du sol (Baker et Cook, 1974; Papavizas *et al.*, 1982), ce champignon a une adaptation écologique très large, sa capacité à croître sur des substrats très peu coûteux, en font un candidat potentiellement intéressant pour de nombreuses applications en lutte biologique (Amsellem *et al.*, 1999). Les propriétés antagonistes des *Trichoderma spp.* s'expliquent par la compétition pour les éléments nutritifs, l'antibiose ainsi que le parasitisme (Yedidia *et al.*, 2000). *Trichoderma spp.* est commercialisé pour lutter contre les agents de fontes de semis, il occupe 50% des BCA fongique mis sur le marché (Verma *et al.* 2007).

Un autre exemple de travaux menés sur *Bacillus spp.* autant qu'agents de lutte contre les pathogènes des produits récoltés et stockés (Sharma *et al.*, 2009). Le premier travail sur le contrôle de la pourriture brune des fruits à noyau par *Bacillus subtilis* était initié par Pusey & Wilson (1984); depuis, beaucoup d'antagonistes ont été identifiés et utilisés pour le contrôle de l'alternariose sur différents fruits et légumes (Tableau 7). L'inoculation artificielle par des agents antagonistes est plus efficace pour le contrôle de l'alternariose sur fruits et légumes que d'autres moyens.

Des produits à base de *Bacillus* sont couramment utilisés en agriculture comme bio-pesticides, fongicides et stimulateurs de la croissance chez les plantes. Certaines espèces de *Bacillus* ont aussi un effet bactéricide et nématocide (Pérez-Gacia *et al.*, 2011). Le contrôle biologique des phytopathogènes par *Bacillus* est principalement due au rôle des lipopeptides

Fengycine et iturine, ces derniers ont été largement caractérisés comme composés antifongiques contre plusieurs champignons et oomycètes phytopathogènes (Romeo *et al.*, 2007 ; Ongena & Jacques, 2008 ; Arrebola *et al.*, 2010). L'iturine peut également avoir un potentiel antibactérien supplémentaire. Les lipopeptides fengicine et surfactine (Tendulkar *et al.*, 2007), semblent agir comme déclencheurs pour l'activation de la résistance systémique induite (ISR) au niveau de la racine de la plante hôte, conduisant à la suppression ou à la réduction des maladies des plantes causées par des agents pathogènes transmis par le sol et l'air (Ongena *et al.*, 2007 ; Choudhary et Johri, 2009). Les lipopeptides surfactine sont essentiels pour la motilité. Les surfactines agissent comme des molécules de signalisation pour la formation de biofilms qui semblent être nécessaire pour la colonisation de la surface des racines et des feuilles par les bacilles associées aux plantes (Jourdan *et al.*, 2009).

Tableau 7 : Quelques antagonistes microbiens utilisés pour le control des *Alternaria* spp. sur fruits et légumes.

Antagoniste	Pathogène	Fruits/légume	Référence(s)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Alternaria solani</i>	Tomate	Brame et Flood (1983)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	Litchi	Jiang <i>et al.</i> (1997, 2001)
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Alternaria solani</i>	Tomate	Sabriye <i>et al.</i> (2011)
<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Alternaria alternata</i> et <i>Penecillium expansum</i>	Jujube	Qin et Tian (2004) Tian <i>et al.</i> (2005)
<i>Enterobacter aerogenes</i> Homaech & Edwards	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	Cerise	Utkhede et Sholberg (1986)
<i>Debaryomyces hansentii</i>	<i>Alternaria sp.</i>	Tomate	Chalutz <i>et al.</i> (1988)
<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	Tomate	Chalutz <i>et al.</i> (1988)
<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Tomate cerise	Yifei <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Jujube	Tian <i>et al.</i> (2005)
<i>Streptomyces longisporus</i>	<i>Alternaria solani</i>	Pomme de terre	Chattopadhyay et Nandi (1982)

<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Alternaria solani</i>	Tomate	El-Farnawany (2006)
<i>Trichoderma spp.</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Cerise	Qin <i>et al.</i> (2004)

3.5. La lutte chimique

A côté des méthodes de luttés culturales, génétiques et biologiques, les traitements chimiques sont largement utilisés pour combattre les maladies fongiques. Le chiffre d'affaire mondiale des produits phytosanitaires avoisine les 44 015 millions de dollars est en hausse de 15% en 2011, la part de fongicides s'élève à 25,8% (UIPP, 2011).

Un fongicide exerce une activité selon l'action exercée au niveau du cycle parasitaire de base : (1) Préventive ou anti pénétrante, s'il agit avant l'infection ; (2) curative, s'il intervient pendant la phase d'incubation ; (3) anti-sporulante s'il empêche la sporulation du parasite ou (4) éradicante, s'il élimine le champignon déjà visible. Par ailleurs, en fonction de son comportement dans la plante, le fongicide est qualifié de produit :

- De surface ou de contact si seule la fraction présente sur la surface traitée entraîne un effet antifongique qui sera donc de type préventif ;
- Pénétrant, s'il présente en quantité suffisante dans les assises cellulaires sous-jacentes aux surfaces traitées pour entraîner un effet curatif ;
- Translaminaire, si après son application sur une surface foliaire, il inhibe le développement d'un champignon inoculé sur l'autre face ;
- Systémique, si après une migration intense via le xylème ou le phloème, il exerce une activité antifongique (préventive ou curative) hors de la zone traitée (Lepiovre, 2003).

Les fongicides sont couramment utilisés pour contrôler la brûlure foliaire et sont constitués de produits protecteurs comme le mancozèbe (Dithane) et le chlorothalonil (Bravo), le manèbe, l'iprodione, le difénoconazole, le cymoxanil + famoxadone, le thiophanate-méthyle et le famoxadone ou des fongicides systémiques appartenant à la classe des strobilurines comme l'azoxystrobine, la pyrachlostrobine et la picoxystrobine (Bartlett *et al.*, 2002 ; Blancard *et al.*, 2012). Les fongicides spécifiques au site sont composés à base de strobilurine s'avèrent très efficace au début, mais la résistance a été identifiée pour un certain nombre de champignons, y compris sur les agents de l'alternariose (Bartlett *et al.*, 2002 ; Pasche *et al.*, 2004). En cours de culture, les plantes doivent être traitées dès que les premiers symptômes sont constatés le

plus rapidement possible. Les applications doivent être renouvelées après de fortes pluies et des irrigations par aspersion car ces dernières favorisent l'extension de la maladie, aussi doivent-elles être réalisées en cours de journée à une période qui permettra aux plantes de ressuyer et de ne pas rester trop longtemps humectées (Blancard *et al.*, 2012). Pour éviter ou éliminer la présence de champignons résistants, la meilleure stratégie consiste à : 1) Mélanger des fongicides systémiques de contact s'ils sont compatibles ; 2) Alternier l'utilisation de ces deux grands groupes de fongicides ; 3) Cesser l'utilisation de fongicides inefficaces ou dont le champignon a été testé résistant (Gilbert, 1999).

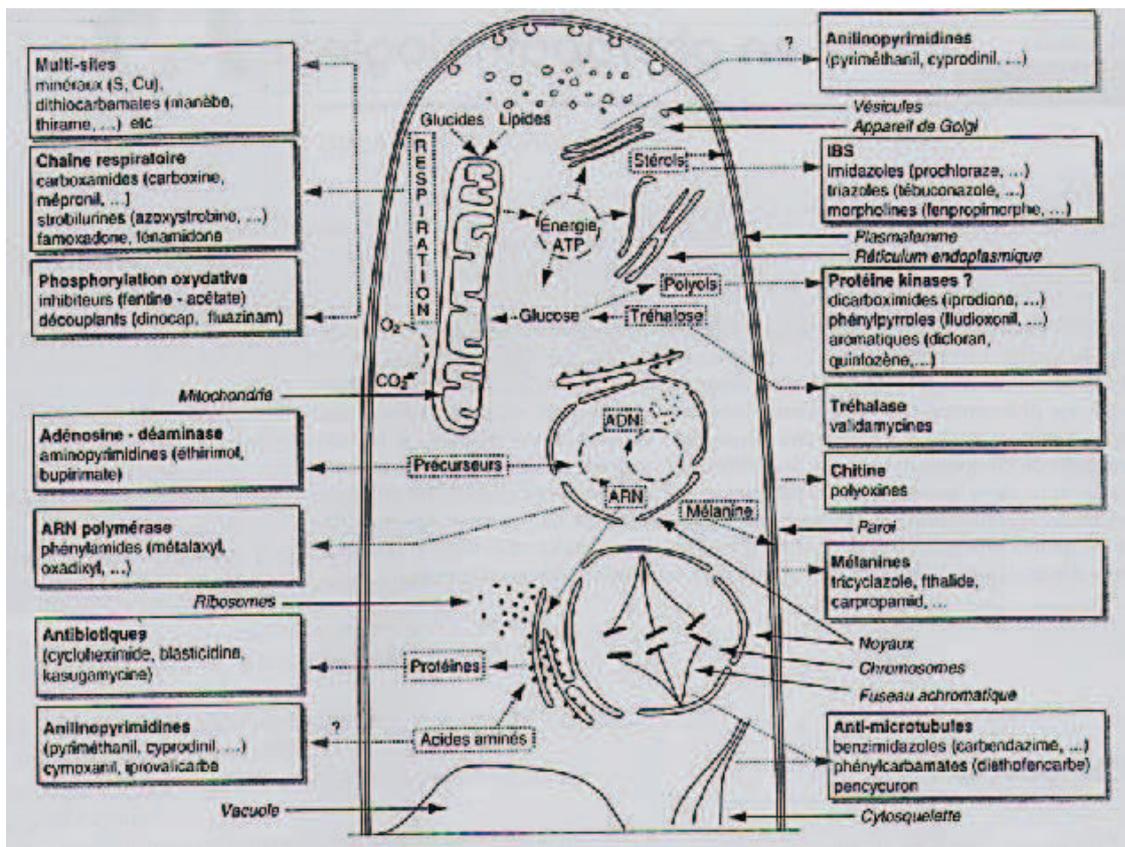


Figure 11 : Sites d'action des principaux fongicides (Lepiovre, 2003).

D'autre part, une pulvérisation de bicarbonate de soude sur plantes de tomate réduirait la germination des conidies d'*A. solani* et *A. tomatophila* et présenterait une certaine efficacité pour contrôler l'alternariose (Ivanovic *et al.*, 2002 ; Blancard *et al.*, 2012). Différentes matières actives appartenant aux familles des Triazoles, inhibiteurs de stérols, et carbammates sont utilisées comme traitement par pulvérisation en cours de végétation (Tableau 8).

Tableau 8 : les matières actives recommandées pour les cultures de tomate et de pomme de terre (ITCMI, 2010).

Matière active	Famille chimique	Spécialité commerciale	Pathogènes	Dose
Tétrachloroisophthalonitrile	Chloronitriles Triazoles	Bravo	<i>Phytophthora infestans</i> <i>Botrytis cinera</i> <i>Septoria sp.</i>	2 l/ha
fénamidone + propamocarbe	Imidazolinones + Carbamates	Consento	<i>Phytophthora infestans</i> <i>Alternaria sp.</i>	1,5 à 2 l/ha
métalaxyl-M (Méfénoxam)	Dithiocarbamates Phénylamides	Ridomil	<i>Phytophthora infestans</i> <i>Alternaria sp.</i>	2.5 Kg/ha

3.5.1. Substances utilisées pour lutter contre l'alternariose des *Solanacées*

Un certain nombre de chercheurs ont déclaré l'efficacité de nombreuses matières actives vis à vis différentes espèces d'*Alternaria* pathogènes des *Solanacées*. Parmi les nombreux fongicides commercialisés, beaucoup d'autres substances sont encore en évaluations aux laboratoires.

Singh *et al.* (1997) ont évalué la combinaison de Emisan-6 avec l'Indofil M-45 qui s'est révélée être très efficace, suivie par la combinaison d'Emisan-6 avec Indofil Z-78 dans le contrôle des *Alternaria* pathogènes de la pomme de terre. Le Mancozèbe (0,2%) s'est révélé plus efficace pour inhiber la croissance mycélienne d'*A. solani*, l'agent de la brûlure foliaire de la tomate (Choulwar *et al.*, 1989 ; Singh *et al.*, 2001). De même, le Mancozèbe (0,2%), suivie par Captafol (0,2%) ont été jugés très efficace contre *A. solani* infectant les plants de tomates (Babu *et al.*, 2001). Prasad et Naik (2003) ont aussi prouvé l'efficacité de certains fongicides non systémiques comme l'Iprodione et le Mancozèbe et des fongicides systémiques comme le Thiophanate méthyle contre le pathogène de la tomate *A. solani*. Cependant, dans des conditions *in vivo*, l'Iprodione (0,2%) et le Mancozèbe (0,2%) ont été efficaces. Un rendement maximal a été enregistré dans le traitement par l'Iprodione ainsi

qu'un taux de rentabilité élevé avec un rapport de 1:11.4 du traitement au Mancozèbe. Thippeswamy *et al.* (2006) ont rapporté que le Mancozèbe, le Carbendazin et le captaf étaient les plus efficaces contre *A. solani* pathogène de l'aubergine. Sarkar et Chaudhary (2004) ont observé que l'effet du Polyram appliqué trois fois (2.5kg / ha) à des intervalles de 15 jours, était significativement supérieure à celui du Captan 50% SP et Mancozèbe 75% WP, dans la réduction de la brûlure foliaire de la tomate causée par *A. solani* et a également augmenté le rendement. De plus, Tiwari *et al.* (2004) ont montré que le Mancozèbe était plus économique lors de la pulvérisation deux fois plutôt qu'une et trois fois. Aussi, l'oxychlorure de cuivre et le Mancozèbe sont plus efficaces dans l'inhibition de la croissance et de la germination des spores d'*A. tomato* (Cooke) GP Weber provoquant des nécroses sur fruit de tomate. En outre le prétraitement par des produits chimiques était plus efficace par rapport à un post-traitement en général (Patel *et al.*, 2005).

D'autre part, Datar (1996) a reporté que les fruits de piment trempés dans l'indole-3-butérique ou Naphthalic acide acétique à une concentration 200µg/l pendant 30 minutes retarde la pourriture des fruits causée par *A. alternata*. L'agent pathogène a été également contrôlé par trempage des fruits pendant 10 min dans une solution de Carbendazime à concentration de 1000µg/ml. Le taux d'expansion des lésions d'*A. solani* sur les plantes de pomme de terre n'a pas été affectée de manière significative par le Chlorothalonil, contrairement au Tébuconazole qui l'a diminué de manière significative (Shtienberg *et al.*, 1996). Kamal *et al.* (2007) ont trouvé que l'incidence de l'alternariose sur fruits et feuilles de tomate était plus faible lors d'un traitement à l'Indofil M-45, avec une incidence de maladie de 1,7% et 4,0%, respectivement. Sidlauskiene *et al.* (2003) ont prouvé l'efficacité de l'Amistar contre l'alternariose du concombre, du chou et de la tomate, l'incidence de la maladie a été réduite de 88 à 93%. L'urée ainsi que de l'urée associée au nitrate d'ammonium (UAN) étaient tous les deux très efficaces pour contrôler *A. tenuissima* (Veverka *et al.*, 2007). Quatre matières actives d'organo-thiophosphonates récemment synthétisées à savoir, la N-(2-éthoxy-2-oxo-éthyl)-2-pyridinylidenamido (diéthyl amido) (phényl) thiophosphonate; N-(2-méthoxy-2-oxo-éthyl)-2-pyridinylidenamido (diphényl amido) (phényl) thiophosphonate, N-(2-méthoxy-2-oxo-éthyl)-2-pyridinylidenamido (diisopropyl amido) (pheynyl) et de N-thiophosphonate (2-méthoxy-2-oxo-éthyl) -2 pyridinylidenamido (cyclohexylamido de N-méthyl) (phenyl) thiophosphonate, présentaient également des activités antifongiques significatives à 100, 250 et 500ppm (Agarwal *et al.*, 2007).

Les dérivés de sulfanilamide de chitosane préparé par Mei *et al.* (2007) ont montré un effet inhibiteur important vis à vis *A. solani* à des concentrations de 50 à 500 µg/ml. Ils ont également constaté que les activités antifongiques de ces dérivés ont augmenté en fonction de l'augmentation de leur poids moléculaire, leur concentration ou leur degré de substitution, aussi les dérivés de sulfanilamide de chitosane, carboxyméthylchitosane et chitosane sulfate ont montré une activité antifongique plus élevée. Pour lutter contre l'alternariose de la pomme de terre, Acrobat MZ (3kg/ha) a été prouvé très efficace. De faibles doses d'Acrobat MZ (2,25kg/ha) et de Dithane M- 45 étaient tout aussi efficace suivie par Delan WP (0,5kg/ha) et Acrobat MZ (1,79kg/ha), ces fongicides n'ont pas non plus montré de symptômes de phytotoxicité comme la nécrose des pointes et le flétrissement et la feuille (Mustafee *et al.*, 2007). D'autre part, Singh (2008) a trouvé que trois pulvérisations à 0,25% de Ridomil MZ (2kg/ha) dans des intervalles de 10 jours ont été les plus efficaces pour lutter contre la brûlure foliaire de la pomme de terre provoquée par *A. solani* suivie par Melody Duo 66,75 WP (2.5kg/ha et 2 kg / ha) et Antracol 70 WP. Parallèlement aux matières actives, le potassium et le bicarbonate de sodium et Nerol (un produit commercial des fractions d'huiles essentielles d'agrumes) ont un effet inhibiteur considérable contre *A. solani* pathogène de la pomme de terre. Une inhibition complète du champignon a été obtenue avec du bicarbonate de potassium ou de sodium à 2% et à 0,5% Nerol. Les traitements combinés de potassium ou le bicarbonate de sodium à 1 ou 2% et à 0,5% Nerol réduisent l'incidence de la maladie de plus de 81,6% et ont augmenté le rendement en tubercules de 82,6 et 72%, respectivement, au cours de deux périodes de végétation. Le traitement le plus efficace était le bicarbonate de potassium à 2,0% combinée à Nerol à 0,5% (Abd-el-Kareem, 2007).

Chapitre 2 :
Matériels et Méthodes

Introduction

Le présent chapitre étudie les méthodologies du diagnostic permettant d'identifier les différentes espèces d'*Alternaria* responsables de la détérioration des cultures maraichères en particulier les *Solanacées*, qui représentent une grande importance économique en Algérie, un préalable indispensable et une mise en œuvre appropriée des moyens de lutte. Les connaissances acquises dans le chapitre précédant décrivant la symptomatologie et l'épidémiologie de ce parasite constituent une démarche primordiale du diagnostic sur la biodiversité des espèces *Alternaria* pathogènes. Cette démarche commence par l'analyse des circonstances qui accompagnent l'apparition des symptômes, se poursuit par la formulation d'hypothèses quant à leur validation au laboratoire, à l'aide de techniques biologiques et moléculaires qui constitueront les majeures étapes de cette étude.

I. Diagnostic, Prospections sur terrain et étude épidémiologique

Ayant peu d'informations sur l'épidémiologie, l'identité de l'agent pathogène (s) est encore très mal connue dans le nord-ouest de l'Algérie. L'un des premiers objectifs de cette étude englobant différents critères du diagnostic qui concerne l'analyse des symptômes et des circonstances entourant l'apparition et le développement de l'alternariose sur les cultures légumières. Les données recueillies sur terrain, nous permettent de formuler des hypothèses sur les espèces d'*Alternaria* causales de la brûlure foliaire. La seconde étape permet de valider les hypothèses formulées et s'appuie sur la microscopie, l'isolement et la mise en culture en vue de la caractérisation des espèces pathogènes.

1. Echantillonnage

Une étude approfondie sur l'incidence de la maladie des *Solanacées* et sa gravité est effectuée dans soixante-cinq différentes régions à maraichage intensif de l'ouest Algérien dans les Wilayas d'Oran, Mascara, Mostaganem, Ain Témouchent, Relizane, Tlemcen et Sidi Bel Abès. Des observations successives sont effectuées durant les saisons (2011-2012 et 2012-2013) dans des champs sélectionnés au hasard des localités pris en considération pour chaque Wilaya. Un à vingt échantillon est prélevé à partir des organes présentant des symptômes (feuilles, tiges, pédoncules, fruits ou tubercules infectés). La fréquence de l'isolement est calculée pour chaque espèce. La gravité de la maladie est déterminée selon la formule décrite par Saleemi *et al.* (2012).

$$\text{Fr (\%)} = \frac{\text{Nombre d'échantillons avec une espèce ou un genre} \times 100}{\text{Nombre total d'échantillons}}$$

Jusqu'à présent, les enquêtes sur l'incidence de la maladie de la brûlure foliaire en Algérie ne sont basées que sur des observations simples par des agriculteurs ou des services consultatifs. La réalisation de ces prospections donnera un aperçu sur la distribution de la brûlure foliaire ainsi que la présence des différentes espèces *Alternaria* dans les principales régions productrices de *Solanacées* au Nord-ouest Algérien.

2. Isolement et purification de l'agent pathogène

Les tissus végétaux naturellement infectés sont immergés pendant 2 min dans 50 ml de NaClO à 2% pour éliminer la flore saprophyte superficielle puis rincés trois fois dans de l'eau distillée stérile. Les tissus végétaux sont ensuite séchés sur du papier filtre stérile (Whatman n°1) avant d'être placés dans des boîtes de Pétri supplémentées du milieu Pomme de terre carotte agar (PCA) (15 ml par boîte), Les boîtes sont scellées avec du papier cellophane puis incubées à 25 ± 1 °C. Après 4 à 5 jours d'incubation, les boîtes sont examinées sous la loupe binoculaire (grossissement x 40), l'identification des colonies développées à partir des fragments infectés est basée sur la morphologie des spores. Des implants de 5 mm² sont découpés à l'anse à partir du bord de colonies puis transférés individuellement sur une nouvelle boîte de du milieu PCA ou pomme de terre saccharose agar (PSA). Les cultures représentant des contaminations bactériennes sont transférées sur milieu amendé avec 50 µg ml⁻¹ de streptomycine.

2.1. Induction de la sporulation des isolats

Certaines espèces du genre *Alternaria* ont une incapacité à produire des spores lors de la culture *in vitro* sur les milieux précédemment mentionnés, et comme sporulation s'avère un élément clé à plusieurs tests tel que l'identification ou l'infection artificielle des plantes... etc., nous avons procédé à l'induction de celle-ci afin d'assurer une production suffisante de spores par la méthode élaborée par Fahim (1966) et modifiée comme suit ; des fragments mycéliens sont prélevés à partir des bords des colonies et placés dans des boîtes de Pétri contenant un milieu à base d'extraits de la plante hôte (Annex 2) (Kozlovski et Kvasnyuk, 1984) sans être scellés au cellophane. Après quatre jours d'incubation à 25 ± 1 °C les colonies sont blessées à l'aide d'un scalpel stérile puis exposées à la lumière directe du soleil pendant 5 min pour stimuler la sporulation fongique, elles sont ensuite incubées 3min à -20°C et remises à température ambiante pendant 24h à l'obscurité.

2.2. Mesure de la sporulation fongique

Pour déterminer la concentration initiale de chaque isolat, 10ml d'eau distillée stérile est ajouté sur cultures en boîte de Pétri, les conidies sont raclées de la surface de la colonie à l'aide d'une pipette pasteur stérile recourbée. La suspension de conidies est collectée et filtrée à travers deux couches de mousseline stérile. La concentration est ensuite déterminée à l'aide d'une cellule de Malassez.

2.3. Culture d'isolats monospores

Les isolats sont purifiés selon la méthode décrite par Sofi *et al.* (2013) modifiée de la manière suivante, 200µl de chaque suspension de conidies ajustée à 10^4 spores ml^{-1} est étalée sur de l'eau gélosée à 2%, les boîtes sont ensuite examinées sous microscope (grossissement x 40) après 24 à 48h d'incubation à $25 \pm 1^\circ C$, les colonies issues d'une seule spore sont transférées individuellement sur milieu PSA à l'aide d'une aiguille stérile.

2.4. Conservation des isolats

La collection d'isolats est conservée à partir des cultures pures cultivées sur PSA incliné en tube ou en boîte, âgées de sept jours, maintenues dans un réfrigérateur à $4^\circ C$ pour des utilisations ultérieures. La conservation est aussi effectuée dans des cryotubes de 1,5ml contenant cinq implants mycéliens d'un cm de diamètre supplémentés avec 1 ml de glycérol à 30%. Ces cryotubes sont placés dans un congélateur à $-80^\circ C$ pour un stockage à long terme.

II. Identification morphologique et étude des caractères cultureux

1. introduction

L'un des aspects les plus importants de la biologie d'un organisme sont les caractères morphologiques et physiologiques d'un individu au sein d'une espèce, qui ne sont pas fixés. Le cas aussi des champignons, mais il n'est pas fréquent chez les individus à reproduction asexuée. Lorsque les caractéristiques morphologiques sont insuffisantes pour identifier un champignon, on utilise les techniques physiologiques et biochimiques. L'étude de la variabilité au sein des populations est importante pour cerner les changements des traits morphologiques et physiologiques afin de confirmer l'existence de différents pathotypes. La variabilité au sein d'espèce est un phénomène bien connu dans le genre *Alternaria* et peut être remarquée dans les changements dans la forme des spores ainsi que leur taille. La diversité apparaît même au sein d'isolats monospores issus d'une même colonie (Roberts, 1924). Pour

mieux connaître et différencier les espèces isolées, les caractéristiques morphologiques, la croissance et la sporulation sur différents milieux de culture sont étudiés, notamment sur diverses sources de carbone et d'azote pour lesquelles ils sont hétérotrophes ainsi qu'à différentes températures et pH.

2. Etude des caractères macroscopiques et microscopiques

Cette identification des *Alternaria* sp. repose sur des critères qui font appel aux caractères culturaux (texture du mycélium, couleur du thalle ou de l'envers de la colonie), et à la taille des spores. Le diagnostic comprend deux parties : la détection du pathogène (décrite I.2.1) et l'identification de celui-ci selon la taille et l'agencement des conidies en cultures pures.

2.1. Evaluation des caractères morphologiques macroscopiques

Les observations sont effectuées 5 à 7 jours sur PSA. L'examen macroscopique incluant les caractéristiques morphologiques de la colonie telle que la nature du mycélium (couleur et aspect du thalle) sont effectués afin de dégager quelques caractères spécifiques. Ainsi le mycélium peut être ras, peu développé, d'aspect velouté, peu duveteux ou aérien à cotonneux et de couleur marron, olivâtre à gris claire ou foncé selon les espèces et les morphotypes. Même si les caractères macroscopiques des colonies semblent être distincts, il est difficile d'identifier ces pathogènes sur ces seuls critères. De plus il est difficile de séparer les espèces pathogènes des espèces saprophytes. Les observations microscopiques permettent d'affiner le diagnostic, dégagant les caractéristiques des spores. Les deux groupes d'espèces *Alternaria* pathogènes des *Solanacées* présentent des spores qui sont différenciés généralement par la morphologie des conidies.

2.2. Examen de la morphologie et de la formation des chaînes de conidies

Dans les cas des *Alternaria* à petites et grosses spores, il est très difficile de séparer certaines espèces étroitement liés tel que *A. alternata*, *A. tenuissima* et *A. arborescens* de la section *alternata* et ceux de la section *porri* comme *A. solani* et *A. tomatophila*. Pour cela, l'examen microscopique des isolats en fonction de la morphologie des spores produites est effectué à l'aide d'un microscope optique (Leitz, Allemagne) et de la littérature disponible (Simmons, 2007). Les structures des chaînes de conidies en trois dimensions sont étudiées après 5 jours d'incubation sur milieu PCA à température ambiante exposés à la lumière naturelle du jour et l'obscurité. La formation de chaînes de conidies sont examinées au microscope au grossissement $\times 40$ ou $\times 100$. La sporulation typique à chaque espèce est photographiée à l'aide

d'un appareil photo. Pour l'étude morphologique des conidies, un examen approfondi est fait au grossissement $\times 400$ à partir suspension de spores montée dans du lactophénol sur une lame de microscope puis mesurées à l'aide d'un micromètre. La taille et la forme des spores incluant le nombre de cloisons, la longueur et leur profondeur sont enregistrées. Les moyennes obtenues pour chaque isolat sont calculées à l'aide du logiciel Microsoft Excel. Trente mesures par isolat sont effectuées dans cette étude.

3. Effet des différents milieux de culture

La caractérisation biométrique est effectuée afin d'évaluer les meilleures conditions de croissance des souches. L'effet de six différents milieux de cultures solides est étudié sur trente-deux isolats du groupe *alternata* et quatre isolats du groupe *porri* sélectionnés. Les milieux ; PCA (Simmons, 2007), Malt Agar (Messiaen *et al.*, 1991), PSA (Samson *et al.*, 2002), Czapek dox (Salam *et al.*, 2006), Mathur (Mathur *et al.*, 1950) et Sabouraud (Dongyou, 2010) (voir annexe 2) sont coulés à raison de 15ml par boîte de Pétri. Après solidification, les boîtes sont inoculées par un disque mycélien de 5 mm à partir de la périphérie des cultures âgées de sept jours de chaque isolat et incubées à 25 ± 1 °C. L'aspect et la pigmentation des colonies sont relevés par observation visuelle après 7 jours pour l'étude des caractères cultureux.

4. Effet des différentes sources de carbone et d'azote

Le comportement *in vitro* en présence de plusieurs sources de carbone et d'azote sur la croissance mycélienne et la sporulation des différents groupes d'*Alternaria* reflète plus ou moins leurs différences nutritionnelles naturelles (Leander *et al.*, 1972). La production d'enzymes (amylase, cellulase...) permet à certaines espèces de dégrader les sources nutritives en composés assimilables. Dans ce travail, plusieurs sources de carbone et d'azote sont testées *in vitro* sur la croissance et la densité mycélienne ainsi que la sporulation d'espèces responsables de la brûlure foliaire des *Solanacées*.

Le milieu de base utilisé est celui de Czapek dox modifiant la source d'azote ou de carbone. Les teneurs en C et N sont maintenues constantes : elles sont de 3% (v/v) de C et de 0,2% (v/v) de N présentes dans le milieu de base (Attrassi *et al.*, 2007). Les solutions carbonées et azotées sont ajoutées au milieu avant autoclavage. Onze sources de carbone sont testées incluant : les monosaccharides (glucose et fructose), les disaccharides (saccharose, lactose et maltose), les polysaccharides (amidon soluble et cellulose), les alcools (glycérol et mannitol)

et un acide organique (acide citrique). Huit sources d'azote sont également testées, l'azote inorganique [KNO₃, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄] et de l'azote organique incluant : les acides aminés (asparagine, arginine, valine et leucine) et les protéines (peptone). Les composés carbonés et azotés sont ajoutés et le pH ajusté à 6,5. Puis stérilisés à l'autoclave pendant 30 min à 120°C. Les boîtes contenant 15ml de chaque milieu sont inoculées au centre par un disque mycélien de 5mm prélevé à partir d'une culture âgée de sept jours puis incubées à l'obscurité et à 25 ± 1°C.

5. Effet de la température et du pH

Les facteurs environnementaux les plus importants qui régissent la croissance et la sporulation des champignons sont la température et la concentration en ions hydrogène (pH). Une légère variation de ces facteurs peut induire des différences marquées dans leurs caractères morphologiques, croissance et sporulation.

Le comportement du champignon en fonction de différentes températures est étudié, à cet effet, des boîtes de Pétri contenant le milieu PSA sont inoculées avec les 36 isolats comme décrit précédemment. Les boîtes sont incubées à différentes températures: 5, 10, 20, 25, 30 et 35 °C (Hubballi *et al.*, 2010). La tolérance à différentes valeurs de pH diffère considérablement chez certaines espèces d'*Alternaria*, leur croissance peut être complètement inhibée dans des milieux, qui sont trop acide ou trop alcalin. Afin de tester l'influence de ce dernier sur la croissance et la sporulation des différents groupes d'isolats, des milieux PSA sont initialement ajustés à une gamme de pH allant de 4,0 à 10,0 en utilisant de l'acide chloridrique (HCl 0,5N) ou une solution alcaline d'hydroxyde de sodium (NaOH 0,5N) (Vijayalakshmi *et al.*, 2012), les boîtes de Pétri inoculées sont incubées à 25 ± 1 °C.

6. Mesure de la croissance mycélienne et la sporulation

La croissance des différents groupes d'espèces d'*Alternaria* est estimée par le diamètre moyen de chaque colonie (mesure de deux diamètres perpendiculaires). Les mesures sont enregistrées le 2^{ème}, 4^{ème}, 6^{ème}, 8^{ème}, 10^{ème} et 12^{ème} jour après l'inoculation ou jusqu'à ce que la croissance mycélienne atteigne le bord des boîtes. La vitesse de croissance par jour est calculée selon la formule utilisée par Sofi *et al.* (2013) :

$$\chi = (\text{Croissance au jour } N \text{ (mm)} - \text{Croissance au jour } N-2 \text{ (mm)})/2$$

L'intensité de la sporulation est estimée pour chaque paramètre après de 10 jours d'incubation selon la méthode décrite précédemment (voir I.2.2.). Le nombre de spores estimés par colonie et le nombre de spores par unité de surface est calculés (Andersen et Thrane, 1996). Dans cette étude, trois répétitions sont effectuées pour tous les essais.

Les différents isolats sont classés en groupes selon des notes attribuées sur la moyenne de la vitesse de croissance mycélienne et la production de conidies en utilisant l'échelle décrite par Attrassi *et al.* (2007) modifiée comme suit dans le tableau (9).

Tableau 9 : Echelle de notation de la vitesse croissance et la sporulation des souches testés

Croissance mycélienne (mm/day)	sporulation ($\times 10^5$ spores.mm ⁻²)	Notes
0 to 3,0	0 to 10	0
3,1 to 6,0	10,1 to 20,0	1
6,1 to \leq	20,1 to \leq	2

7. Analyse statistique

La vitesse de croissance mycélienne des isolats et leur nombre de conidies par unité de surface pour chaque combinaison de traitement sont évalués pour une analyse ultérieure des données. Les données sont analysées statistiquement et les moyennes des traitements sont comparées. La classification ascendante hiérarchique (Ward, 1963) selon les paramètres morphologiques, physicochimiques et nutritionnelles combinés est réalisée en utilisant le logiciel STATISTICA 5.0. La distances euclidiennes est calculée selon la formule: $100 \times \frac{\text{distance entre deux points}}{\text{la distance maximale}}$. Cela a permis l'interprétation des résultats entre 0-250%.

III. Identification moléculaire des souches

1. Introduction

L'identification des espèces pathogènes par leurs caractéristiques morphologiques est reliée à certains problèmes, tel que le transport des échantillons frais au laboratoire, l'isolement des cultures pures, la contamination par la des espèces saprophytes, la production de mycélium stérile et la dépendance de la morphologie des conidies aux conditions de cultures. Par conséquent, les caractéristiques morphologiques basés sur l'analyse de la structure du génome, sont particulièrement importants à cette d'étude, le but de celle-ci est d'étudier la composition des principales espèces incriminées dans la brûlure foliaire, isolées au Nord-Ouest Algérien en utilisant des marqueurs moléculaires.

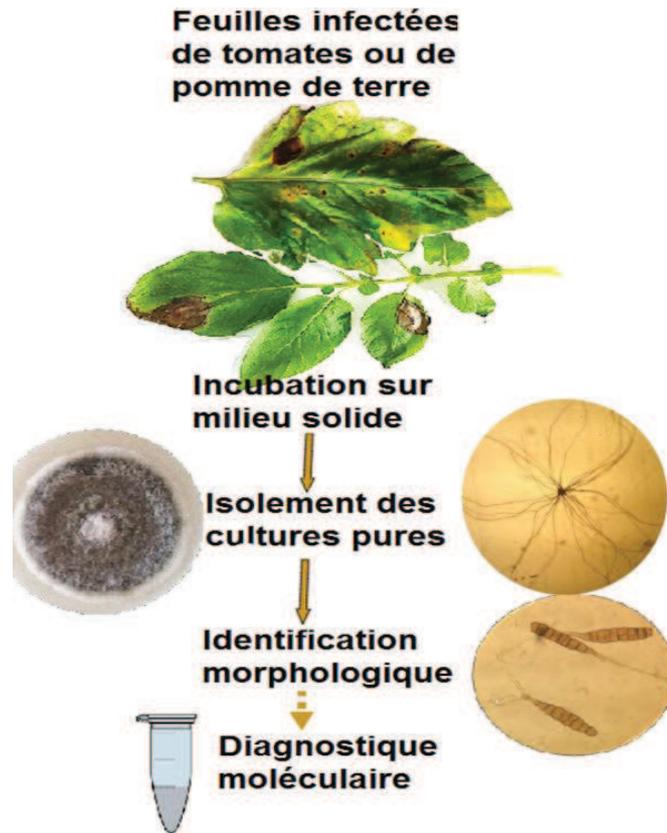


Figure 12 : Méthode de routine pour l'identification des espèces.

2. Détection moléculaire des *Alternaria sp.* sur tissus infectés

L'analyse visuelle des symptômes ne permet pas de distinguer si la tache nécrotique est causée par *A. solani*, *A. tomatophila* ou les espèces de la section *alternata*. L'objectif de cette étude est donc d'enquêter sur la présence et la répartition des différentes espèces sur les feuilles infectées. Pour cela, les méthodes basées sur l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sont utilisées pour le diagnostic moléculaire spécifique (Bahnweg *et al.*, 1998). Au-delà des caractéristiques morphologiques, la PCR permet une différenciation claire et simple de ces agents pathogènes, qui peuvent être utilisés indépendamment des symptômes ou la sporulation typique. L'extraction de l'ADN du parasite est effectuée directement à partir des échantillons de feuilles infectées, collectés dans les soixante-cinq régions, ces échantillons sont fixés à l'alcool à 70% et conservés directement après récolte à -20°C. L'ADN est ensuite extrait par la méthode décrite comme suit. Pour la détection des différents *Alternaria sp. in planta*, des amorces spécifiques sont utilisés pour les tests PCR (Gannibal *et al.*., 2013). Cela permettra de confirmer l'identification des espèces à petites et grosses spores, ainsi que la mise en évidence des contaminations dues aux champignons appartenant à d'autres genres.



Figure 13 : Méthode de détection rapide.

3. Extraction de l'ADN fongique

Une méthode rapide est utilisée pour l'extraction de l'ADN total à partir de 189 isolats et divers tissus végétaux décrite par Goodwin et Lee (1993). Cette méthode utilise un four à micro-ondes pour l'altération des parois cellulaires et des membranes, ce procédé efficace et rapide permet d'éliminer plusieurs sources de contamination qui peuvent être trouvés dans d'autres méthodes d'extraction d'ADN.

L'ADN total est extrait à partir du mycélium recueilli par grattage de 0,5cm² de la surface des colonies cultivées sur milieu PSA et/ ou à partir des fragments de feuilles infectées placés dans un tube eppendorf de 1,5ml. Dans chaque cas, 100µl de tampon de lyse (50mM Tris-HCl pH 7.5, 50m M EDTA, 3% SDS, 1% 2 mercaptoethanol) est ajouté, les tubes sont placés au microonde (850 W) avec couvercle ouvert pendant 15sec, 10sec et 5sec et entre chaque traitement 5 à 10 sec pour éviter que le mélange boue, 300µl de tampon de lyse chauffé à 80°C est immédiatement ajouté pour une incubation au bain marie à 80°C pendant 10min. Après incubation, 400µl de phenol-chlo-iso (25 : 24 :1) est ajouté, les échantillons sont mélangés au vortex pendant 15sec puis centrifugés à 15000g pendant 15min. La phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube auquel est ajouté 0.45 volumes d'isopropanol et 10µl d'acétate de potassium 5M. Après centrifugation pendant 10min à 10000g, le surnageant est éliminé et le culot lavé avec 250µl d'éthanol à 80%, cette opération est répétée deux fois. Le culot est ensuite séché au speed-vac pendant 5 min et repris dans 100µl de tampon TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA). Les matrices sont stockées à -20 °C pour des utilisations ultérieures.

4. Caractérisation moléculaire des isolats

Nous émettons l'hypothèse que plus de deux groupes d'espèces causent la maladie de la brûlure foliaire sur ces hôtes. L'analyse de 34 isolats de pommes de terre, 144 de tomate et 4 de l'aubergine est effectuée à partir de la collection obtenue dans les saisons de 2011-2013 dans les sept Wilayas du Nord-Ouest Algérien. Une étude comparative de la structure du

génomique est réalisée pour quatre souches à grosses spores et 85 souches à petites spores afin de comparer entre les séquences des régions ITS de l'ADN ribosomique. Ces régions ne présentent généralement pas ou peu de variation intraspécifique mais peuvent varier à l'intérieur du genre chez les champignons.

Les séquences partielles des régions ITS et celles des gènes codants pour les facteurs d'élongation sont amplifiées par PCR à l'aide de la paire d'amorces spécifiques aux champignons (ITSF1 - ITS4) (Gardes et Bruns, 1993) ou la paire d'amorces universelles (ITS1 - ITS4) (White *et al.*, 1990 ; Gardes *et al.*, 1991). La paire d'amorces (EF1- 728F et EF1- 986R) (Carbone & Kohn, 1999) pour l'amplification des gènes codant pour les facteurs d'élongations.

La paire d'amorces (DeHF - E8T7) est utilisée pour amplifier le gène de ALT1 (Egusa *et al.*, 2009 ; Jia *et al.*, 2012) qui code pour la toxine AAL spécifique au pathotype de tomate *A. arborescens* Syn *A. alternata* f. sp. *lycopersici* (Xiangcheng *et al.*, 2008), les résultats sont comparés par rapport à la souche de référence *A. arborescens* (CBS 102-605).

Pour la détection et l'identification des espèces *Alternaria* en culture pure et sur tissus végétaux on utilise des méthodes basées sur la PCR avec des amorces oligonucléotidiques spécifiques. Le groupe d'espèces étroitement apparentées comme *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, sont détectés ou identifiés par la paire d'amorces (AAF2 et AAR3) qui amplifie un fragment de 341pb correspondant à une partie des régions ITS et du gène 5.8S (Konstantinova *et al.*, 2002). Les amorces spécifiques d'*A. solani* (OAsF7 et OAsR6) capables d'amplifier un fragment de 164pb du gène *Alt a1* ainsi que les amorces (OAtF4 et OAtR2) capables d'amplifier un fragment de 438pb du gène codant pour la calmoduline (Gannibal *et al.*, 2013), sont utilisées pour la détection de *A. tomatophila* et confirmer son identification.

Tableau 10 : les amorces testées et leur séquence nucléotidique

Amorce	Séquence
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITSF1	5'- CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
EF1-728F	5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'

EF1-986R	5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3'
OAsF7	5'-CGACGAGTAAGTTGCCCTCA-3'
OAsR6	5'-TGTAGGCGTCAGAGACACCATT-3'
OAtF4	5'-TGCGGCTTGCTGGCTAAGGT-3'
OAtR2	5'-CAGTCGATGCGGCCGTCA-3'
AAF2	5'-TGCAATCAGCGTCAGTAACAAAT-3'
AAR3	5'- ATGGATGCTAGACCTTTGCTGAT-3'
DeHF	5'-CTCCGCCTGCCAATGTGATTAC-3'
E8T7	5'-GCGTACCAAGGCACGTGCTCAA-3'

5. Dosage des acides nucléiques

La quantité et la qualité de l'ADN génomique sont évaluées par deux méthodes ; la première s'effectue par le dosage des acides nucléiques au spectrophotomètre (Nano Drop® ND-1000, Nyxor Biotech) : l'appareil est étalonné en plaçant 2 µl de tampon TE dilué 10 fois sur une fibre optique receveuse. Une sonde fibre optique est abaissée au contact de la goutte de TE ce qui crée un pont liquide entre les deux fibres optiques. La même opération est réalisée avec 2µl d'eau Milli Q stérile. Les matrices d'ADN sont dosées en plaçant 2µl de chaque échantillon entre les deux fibres optiques. La concentration d'ADN est directement calculée par un logiciel, puis ajustée à 100 ng.µL⁻¹ avec de l'eau ultra-pure stérile ; La deuxième méthode se fait par électrophorèse en gel d'agarose décrite dans (III.6.). La concentration en ADN est déterminée par la comparaison de l'intensité de la fluorescence de la bande d'ADN à celle des bandes de concentration connues du standard d'ADN en échelle de 10Kpb (Eurogentec, Smart Ladder). Un ADN de qualité se caractérisait par l'absence d'une trainée fluorescente causée par la migration de plusieurs fragments d'ADN de faibles masses moléculaires.

6. Réaction par amplification PCR et électrophorèse sur gel

Toutes les réactions d'amplification sont réalisées dans un volume réactionnel de 50 µl contenant 75 mM Tris-HCl pH 9.0, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% (p / v) de Tween 20, 1.5 mM de MgCl₂, 200 pM de chaque triphosphate de désoxyribonucléotide (Promega), une unité de

ADN polymérase thermostable GoTaq® (Promega) 400 nM de chaque amorce (tableau 10) et 2µl d'ADN (environ 1ng). Les PCR sont réalisées dans un thermocycleur (Modèle Bio-Rad®). Les conditions d'amplification par PCR sont initiées par une étape de dénaturation à 94 °C pendant 5 min et une élongation finale de 10 minutes à 72°C pendant 30 à 35 cycles. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation de 30 secondes à 94 °C, une étape d'hybridation de 30 secondes à 55 °C et une étape d'élongation de 1 min à 72 °C.

Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose (1.2% p / v) dans du TAE 0.5× (20 mM Tris-acétate pH 8, 0.5 mM EDTA). L'ADN est repéré par fluorescence aux ultra-violets (312 nm) après avoir été mis en contact avec du bromure d'éthidium (BEt). Les tailles en paires de bases des divers fragments sont estimées par rapport à un marqueur de taille (Smart Ladder de 0.2-10kpb et 0.08-10Kpb).

7. Purification des produits PCR ITS1 F-ITS4 et facteur d'élongation

Cette étape permet d'éliminer tout contaminant pouvant nuire aux réactions de séquençage. Les produits PCR combinés sont purifiés par centrifugation sur mini colonne (NucleoSpin® Extract II) l'ADN se lie, en présence d'un sel chaotropique à une membrane de silice. Le mélange de liaison est chargé directement sur des colonnes NucleoSpin® Extract II. Les contaminations telles que des sels et des composants macromoléculaires solubles ou les trace de dNTPs libres d'amorces sont éliminés par une simple étape de lavage avec du tampon NT3 éthanolique. L'ADN pur est finalement élué dans des conditions de faible force ionique avec un tampon légèrement alcalin NE (5 mM Tris-Cl, pH 8.5).

8. Séquençage

Les produits PCR ITS1F-ITS4 et facteurs d'élongation purifiés sont utilisés comme matrice au séquençage directe par PCR. La région ITS1 est séquencée par l'amorce ITSF1. Le séquençage de l'ADN est réalisé par la société GATC (Allemagne) à partir des produits des de l'ADNr amplifiés et des gènes codant pour le facteur d'élongation est réalisé avec un séquenceur automatisé. Les amorces utilisées pour l'amplification des régions étudiées, sont également utilisées au tant qu'amorces de séquençage. La lecture de chaque séquence est effectuée en utilisant les amorces sens. Toutes les séquences d'ADN, obtenus au cours du séquençage, sont combinées dans une base de données, utilisées pour la reconstruction des relations taxonomiques entre les espèces étudiées. L'homologie des séquences connexes est étudiée en utilisant BLAST (outil de recherche bioinformatique). Les séquences utilisées pour

la comparaison sont obtenus à partir de la base de données NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et les détails sont donnés dans les résultats. L'alignement des séquences multiples est réalisé en utilisant le logiciel Clustral W (Hall, 1999) et l'arbre phylogénétique est établi en utilisant une analyse de phylogénie moléculaire (Dereeper *et al.* 2008).

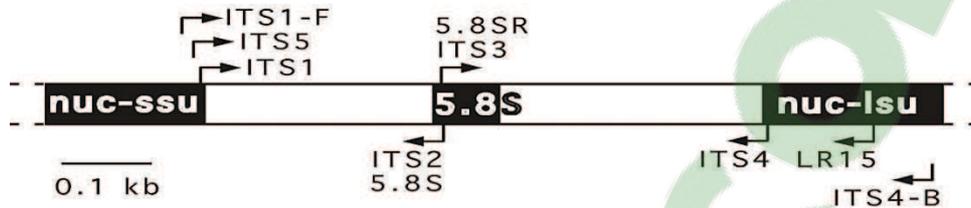


Figure 14 : L'arrangement des gènes et des séquences inter géniques nucléaire dans la région d'ADNr et la localisation des ITS1 et ITS4.

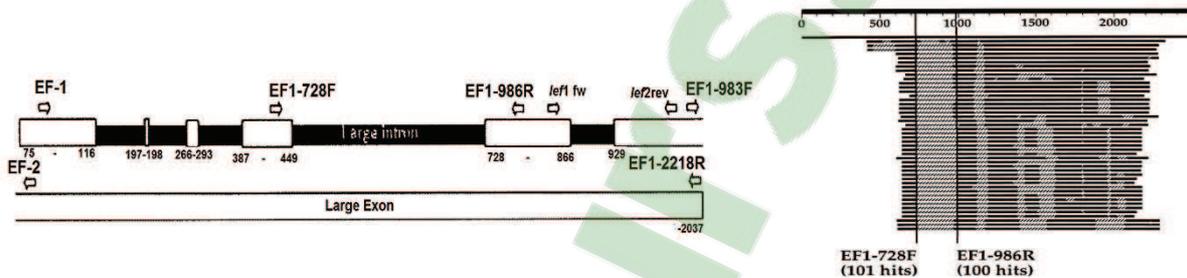


Figure 15 : L'arrangement des gènes et des séquences inter géniques nucléaire dans les régions des facteurs d'élongation et la localisation des amorces EF1-728 et EF1-986 dans cette région (Carbone & Kohn, 1999).

IV. Test du pouvoir pathogène

1. Introduction

L'isolement d'un pathogène ne suffit pas toujours à affirmer son rôle, l'identification doit être complétée par l'étude de son action sur son hôte, qui est utile au diagnostic. Aussi, l'étude de la relation hôte - pathogène est une étape importante permettant de distinguer les isolats susceptibles de provoquer la dissolution de la paroi des tissus végétaux par des enzymes entraînant la mort des tissus, caractéristique des nécroses de la brûlure foliaire (Pennypacker, 1981). Les essais menés sur plantules de tomates dans des conditions environnementales favorables contrôlés sont reproductibles et offrent des résultats plus fiables. Selon Banerjee *et al.* (1998) et Foolad *et al.* (2000), les résultats des essais sous serre et sur le terrain correspondent bien au dépistage. D'autre part, l'importance des espèces *Alternaria* dans la brûlure foliaire est perçue différemment. En particulier l'impact des espèces à petites spores,

principalement ceux de la section *alternata* qui est discuté et controversé. Tandis que certains chercheurs considèrent les espèces appartenant à la section *porri* et *alternata* comme agents causals, ou discutent d'un complexe pathogène *A. solani* et *A. alternata* (Leiminger et Hausladen, 2012, 2013). D'autres sont convaincus que seul *A. solani* et *A. tomatophila* sont pathogène (Turkensteen *et al.* 2010 ; Rodrigues *et al.*, 2010). Dans le dernier cas *A. alternata* serait un saprophyte, qui colonise les lésions foliaires où ces lésions sont trouvées (par exemple dans les zones endommagées, ou suite à une variation particulière, causés par *A. solani* ou *A. tomatophila*, etc..) et est à cet effet un envahisseur secondaire parmi les différentes opinions considérant *A. solani* et *A. tomatophila* comme pathogènes. Pour cela, différentes expériences sont réalisées avec l'objectif de contribuer à l'élucidation de l'importance des espèces de la section *alternata* et de la section *porri* responsables de la brûlure foliaire avec une comparaison entre différentes méthodes afin de confirmer l'analyse de la virulence des différentes espèces sur les tomates.

2. Méthode des folioles détachées

La gravité de la maladie est déterminée plus précisément et objectivement par la mesure de la taille des lésions lorsque l'inoculum est appliqué comme de simples gouttes sur des feuilles de tomate (Nash et Gardner, 1988 ; Chaerani et Voorrips, 2006). Locke (1948) a utilisé des tests sur folioles de tomate détachées comme un moyen de contourner l'influence du mode de croissance de l'alternariose pour l'évaluation de leur résistance, ce qui peut affecter la réaction de plantes dans le champ ou sous serre. Une autre méthode consiste à l'application de gouttelettes d'inoculum sur des folioles jeunes, complètement développées, perforées (Locke, 1948) ou non perforée (Foolad *et al.*, 2000). Selon Locke (1948) la méthode s'avère fiable. La question qui se pose est de savoir si oui ou non toutes les espèces à petites spores sont capables de provoquer des nécroses. Cette expérience est réalisée dans des conditions *in vitro* pour étudier le pouvoir pathogène de trente-deux isolats d'*Alternaria* à petites spores en utilisant les techniques sur feuille détachée décrites par Reni *et al.* (2007) et Mmbaga *et al.* (2011).

2.1. Préparation de l'inoculum

Les inoculums sont préparés à partir des cultures sur milieu PSA en deux répétitions. Les colonies sont inondées avec 10ml d'eau distillée stérilisée contenant 0,01% de Tween 80 (polyxyéthylène sorbitan monolaurate) comme agent mouillant. La concentration en spores

est déterminée au microscope à l'aide de la technique de hémocytomètre puis ajustée à 10^5 spores/ml (Brame et Flood, 1983).

2.2. Inoculation des feuilles détachées

La variété de tomate Saint Pierre est cultivée sous serre à l'ITCMI. Ces plantes n'ont pas reçu de traitement fongicide. Les folioles de tomates saines sont détachées à partir des feuilles n° 5, elles sont désinfectées pendant 30 sec à l'éthanol 70%, rincées à l'eau distillée stérile, séchées et placées dans des boîtes de Pétri en verre de 90 mm de diamètre avec des papiers filtre stériles humidifiés. Afin de donner aux isolats un maximum de chances pour infecter, des petites plaies sont infligées au centre de la face supérieure des folioles à l'aide d'une aiguille stérile. Les autres folioles sont utilisées sans blessure. La surface supérieure des folioles (blessées et intactes) est inoculée avec une goutte de l'inoculum préparé (20 μ l / foliole) de chaque isolat, les témoins sont inoculés avec le même volume d'eau distillée stérile. D'autres folioles sont inoculées avec des implants mycéliens placés au centre et les témoins sont inoculés avec des disques de PSA stérile. Trois répétitions sont effectuées pour chaque test et pour chaque isolat. Les boîtes sont scellées et incubées dans une étuve à 25 ± 1 °C. Les données concernant la chronologie des différentes étapes intervenant dans le test (contaminations, mise en incubation des folioles et observations) sont présentées dans le tableau (11).

Tableau 11 : Chronologie des étapes.

Etapes	Jours
Contamination (transfert de l'inoculum sur folioles intactes et blessées)	J ₀
Incubation (pénétration et colonisation des tissus hôtes)	J ₀ - J ₈
Observations (expression des symptômes)	J ₄ ; J ₆ ; J ₈
Ré-isolement (confirmation des postulats de Kock)	J ₈

Le diamètre des lésions nécrotiques (mm²) ainsi que le pourcentage de l'infection par foliole sont déterminés et calculés. L'analyse des résultats des essais de virulence est réalisée sur la base de la classification non hiérarchique (Digby et Kempton, 1987) à partir des moyennes et de l'écart-type. Il est souvent constaté que les méthodes non hiérarchiques fournissent une classification plus acceptable en minimisant la ségrégation des groupes. Les groupements obtenus sont aussi plus robuste que chaque similitude aberrante entre les paires d'unités individuelles (Digby et Kempton, 1987).

3. Test sur plantules de tomates

Les méthodes d'évaluation sous serre de la résistance ou sensibilité de la tomate vis-à-vis à l'alternariose sont basées sur la méthode établie par Barksdale (1969). En général, les plants sont inoculés par pulvérisation avec des spores âgées de 4 à 6 semaines (Barksdale, 1969 ; Nash et Gardner, 1988 ; Banerjee *et al.*, 1998 ; Vloutoglou et Kalogerakis, 2000 ; Foolad *et al.*, 2000). Les plantes sont incubées pendant 24 h sous une humidité relative de 100% (RH), suivie par 12-16h de 100% d'humidité relative la nuit pendant 5 à 7 jours, imitant la rosée nocturne répétée dans la nature. Pendant la journée, les plantes sont exposées à la température humidité relative et ambiante pour permettre le développement de symptômes de la maladie. Une période de mouillure d'au moins 4h après l'inoculation est nécessaire pour l'infection (Moore, 1942 ; Vloutoglou et Kalogerakis, 2000). La gravité de la brûlure foliaire est généralement estimée 7 jours après inoculation par pulvérisation, la zone nécrosée et le pourcentage de l'incidence de la maladie sur les feuilles est liée aux spores qui étaient présentes au moment de l'inoculation (Barksdale, 1969 ; Vloutoglou *et al.*, 2000). Dans le cas d'une faible incidence des taches nécrotiques, la gravité de la maladie est exprimée par le nombre de lésions (Barksdale, 1969). En dépit de leurs avantages, l'inconvénient des essais *in vivo* sous serre est qu'ils sont lents en main d'œuvre et pour l'obtention de résultats.

3.1. Le matériel végétal

Pour cette étude différents isolats sont sélectionnés afin d'évaluer leur capacité invasive hôte et non-hôte vis-à-vis trois différentes variétés de tomates à savoir ; deux variétés sensibles les plus cultivées en Algérie Saint Pierre et Rio Grande (Snoussi, 2010 ; ITCMI, 2010) et la tomate cerise. Les plantules sont cultivées sous serre après une pré-germination *in vitro* des graines de tomate. Ces graines sont d'abord stérilisées en surface et déposées sur du papier filtre stérile mouillé dans des boîtes de Pétri en verre pendant 5 à 7 jours dans l'obscurité à 25 ± 1°C (figure 16. A). Les graines germées de chaque variété sont transplantées dans des pots

remplis d'un mélange de $\frac{3}{4}$ de terreau et de $\frac{1}{4}$ de sable stérilisé et sont cultivées sous serre. Les plantules âgées de trois à quatre semaines (stade 4 feuilles) sont utilisées pour l'inoculation (figure 16.B).



Figure 16 : (A) germination des graines de tomates après 5 jours d'incubation ; (B) plantules de tomates cultivées sou serre âgées de 4 semaines.

3.2. Réaction variétale

Ces expériences sont réalisées afin de tester la sensibilité des différentes variétés de tomates, à savoir ; var. Saint Pierre, Rio Grande et tomate cerise, à l'alternariose. Le calcul de l'incidence de la maladie en une seule évaluation, notamment celui des folioles détachées, peut sous-estimer ou surestimer le niveau réel de la résistance de l'hôte, la raison pour laquelle des évaluations *in vivo* sur plantules de tomates avec plusieurs observations dans le temps sont utilisés pour calculer l'aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC) après 7, 14 et 21 jours post inoculation (JPI). L'AUDPC mesure donc la quantité totale de la maladie sur une période de temps, déterminé à partir de graphiques de maladie vs temps et intègre donc l'effet du pathogène sur l'hôte et les effets environnementaux lors de l'épidémie (Pandey *et al.*, 2003). La valeur de l'AUDPC est calculée à l'aide du logiciel Image J sur la base de la formule utilisée par Shaner et Finney (1977) :

$$\sum_{i=1}^{n-1} \left[\left(\frac{X_{i+1} + X_i}{2} \right) \times (t_{i+1} - t_i) \right]$$

Où X_i est l'indice de la maladie exprimée en proportion à la $i^{\text{ème}}$ observation; t_i est le temps (jours après la plantation) des $i^{\text{èmes}}$ observations; et n est le nombre total d'observations.

3.3. Evaluation de l'agressivité des différentes espèces sur plantules de tomate

Le fait que les deux groupes d'espèces ont pu être isolés à partir des lésions typiques n'indique pas nécessairement que ces espèces sont virulentes. Sur la base de nos études à grande échelle des lésions sur les tissus foliaires de *Solanacées* au cours des dernières années, nous avons commencé à avoir des doutes sur les capacités de certains pathogènes de la section *alternata*. Si ces champignons sont un vrai agent pathogène et en quantités élevées, il devrait guère y avoir de plante saine laissé au repos sur le terrain. Cette hypothèse nous a conduit à étudier le rôle de ces champignons et leur agressivité par rapport à leur deux grand frères *A. tomatophila* et *A. solani*. Pour cela, différents isolats à petites et grosses spores d'origines différentes sont sélectionnés dans cette étude afin d'évaluer et de comparer leur agressivité sur la variété de tomate sensible Saint Pierre. Six isolats de la section *alternata* obtenus d'hôte diverses sont également testés pour leur pathogénicité non hôte sur plantules de tomate (tableau 16). En parallèle, des inoculations mixtes contenant le complexe pathogène (*A. alternata* ou *A. tenuissima*) + (*A. solani* ou *A. tomatophila*) sont effectuées, l'idée derrière est de vérifier si le complexe des deux espèces conduit à des infections plus fortes.

L'incidence de la maladie est évaluée en termes de pourcentage de défoliation et la fraction moyenne de la surface foliaire nécrosée sur la plante (Horsfall et Barrat, 1945). Les symptômes sur les feuilles supérieures peuvent être ignorés car les zones nécrotiques sur ces feuilles sont moins de 2% de l'ensemble des dommages au cours de la période de croissance (Basu, 1974). Par conséquent, à compter le nombre de feuilles avec 75% à 100% de nécrose dans la moitié inférieure des plantes (Basu, 1974) ou estimer le pourcentage de zone nécrotique dans le tiers médian du couvert végétal (Christ, 1991), s'avèrent des indicateurs fiables pour la gravité de la brûlure foliaire. Dans cette étude, la quantification de la maladie provoquée par les différentes espèces d'*Alternaria* est déterminée pour chaque feuille et chaque plantule par évaluation visuelle des symptômes pour chaque isolat et complexe pathogène comme décrit dans Rodriguez *et al.* (2007). L'intensité de l'infection est évaluée en utilisant l'échelle décrite dans Boedo *et al.* (2012), basée sur des notes allant de 0 à 5 en fonction du pourcentage de l'infection pour chaque plantule mentionnée dans le tableau (12).

Tableau 12 : Echelle de notation de l'incidence de la maladie

Note	Pourcentage de l'infection
0	pas de symptômes pathologiques visibles
1	< 5% de la surface foliaire affectée
2	5% ≤ la surface foliaire atteinte <20%,
3	20% ≤ de surface foliaire atteinte <40%,
4	40% ≤ de surface foliaire atteinte <60%
5	≥ 60% de la surface foliaire affectée

4. Inoculation des plantes testées

Les suspensions de conidies sont préparées selon la méthode décrite par Boedo *et al.* (2012). Les cultures fongiques âgées de 7 à 14 jours cultivées sur milieu PSA ou milieu à base d'extraits de feuilles de tomate, les boîtes sont inondées avec de l'eau distillée stérile et les conidies sont délicatement délogées avec une pipette pasteur recourbée. Les suspensions de mycélium et de conidies sont ensuite filtrés à travers une mousseline stérilisée, la suspension de conidies collectée aseptiquement dans un tube à essai est ajustée à une concentration finale de 10^5 conidies/ml pour les isolats à petites spores (Nadia *et al.*, 2007 ; Kumar et Srivastava, 2013) et à 10^4 conidies/ml pour les isolats à grosses spores et les inoculations mixtes (Arunkumara, 2006), dans un volume final de 10ml. L'inoculum est utilisé pour les infections mixtes avec un rapport (50: 50 v/v) de chaque suspension de conidies. La conception des tests est réalisée avec trois répétitions pour chaque traitement particulier.

L'inoculation artificielle par pulvérisation de l'inoculum est nécessaire pour améliorer l'infection naturelle et d'obtenir une pression uniforme de la maladie (Nash et Gardner, 1988), pour cela, les plantules de tomate sont inoculées manuellement par pulvérisateur. Afin de maintenir une atmosphère saturée en humidité, les plantules sont recouvertes par des sachets de polyéthylène pendant 48h (Pelletier et Fry, 1989 ; Shahbazi *et al.*, 2011), et aspergées une fois par jours avec de l'eau distillée stérile pendant les sept jours qui suivent l'inoculation. Parallèlement et dans les mêmes conditions, les lots de plantules témoins sont pulvérisés avec 10 ml d'eau distillée stérile (Kumar et Srivastava, 2013).

5. L'incidence de la maladie

L'incidence de la maladie en pourcentage est calculée après chaque évaluation selon la formule suivante proposée par James (1974) :

$$\text{Incidence de la maladie (\%)} = \frac{\text{Nombre des feuilles atteintes}}{\text{Nombre total de feuilles examinées}} \times 100$$

Les plantes sont évaluées selon l'incidence de la maladie à partir d'observations hebdomadaires du développement des symptômes (les taches foliaires avec un centre brun, lésions sur feuilles et tiges ainsi que les feuilles mortes).

6. Ré-isolement du parasite

Afin de confirmer les postulats de Kock et d'assurer que les symptômes observés sont provoqués par le(s) même(s) pathogène(s), deux méthodes ; directe et indirecte sont effectuées à partir des tissus de plantules de tomate infectées.

La méthode directe consiste à extraire l'ADN du pathogène à partir des tissus de l'hôte qui est ensuite analysés par PCR en utilisant les amorces spécifiques à chaque espèce ou groupe d'espèce. La méthode indirecte consiste à rechercher le parasite dans les tissus infectés par ré-isolement sur milieu PCA (voir I.3.), puis comparées morphologiquement avec les cultures mères de chaque espèce en boîtes Pétri contenant le même milieu.

V. Lutte chimique

1. Introduction

Le moyen le plus efficace pour contrôler l'alternariose sur *Solanacées* est la lutte chimique. Parmi les fongicides homologués contre les espèces telle que *A. solani* et *A. tomatophila* responsables de la pourriture oculaire des fruits de tomates, le cabrio EG (matière active : pyraclostrobine 20%) possède un effet inhibiteur de la croissance mycélienne et la germination des spores de ce champignon (Snowdon, 1991 ; Pitt et Hocking, 1997), aussi l'application de l'amistar permet un contrôle efficace de l'alternariose sur feuilles et tubercules de pomme de terre. Le traitement avec les benzimidazole est sans effet pour *Alternaria crassa* (qui s'attaque aux cultures maraichères telles que l'aubergine et dont l'hôte naturel est *Datura stramonium*) qui s'y adapte très vite. Cependant une baisse de l'efficacité des certains programmes de lutte chimique contre cette maladie est constaté chez certains

agriculteurs en Algérie, celle-ci pourra être liée à l'apparition de souches résistantes à certaines matières actives au sein des populations du complexe pathogène.

Nous avons donc mené une étude dont l'objectif est de rechercher dans la collection des isolats *Alternaria* à petites spores, la présence de souches exprimant des résistances en évaluant leur sensibilité à des concentrations de NaCl déterminées.

2. Analyse de la sensibilité osmotique

Un premier criblage est réalisé *in vitro* en utilisant trente-deux isolats afin d'étudier leur comportement vis à vis un stress osmotique. Des études ont montré que des mutants des différentes espèces fongiques obtenus au laboratoire sont résistants à certains fongicides et sont plus osmosensibles que les souches sauvages (Fujimura *et al.*, 2000). De ce fait, des milieux PSA à différentes concentrations de NaCl (2% et 4%) en boîtes de Pétri inoculées par des explants mycéliens de 5mm de diamètre prélevés à l'emporte-pièce. Pour chaque souche, l'expérience est répétée trois fois sur chaque milieu. Des milieux PSA sans ajout de NaCl servant de témoins sont également préparés. Les boîtes sont placées en incubation à l'obscurité à $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Pour chaque souche et par comparaison avec la croissance sur milieu témoin (PSA), le pourcentage d'inhibition de la croissance, lié à la pression osmotique du milieu est déterminé.

3. Sensibilité vis-à-vis certaines matières actives

L'objectif de cette étude est de tester l'efficacité *in vitro* de neuf substances chimiques de la famille des dithiocarbamates synthétisées au laboratoire de chimie organique appliquée de l'Université d'Oran (Tableau 13), et d'évaluer le niveau de résistance et le pourcentage d'inhibition chez deux souches ; l'une osmo-sensible et l'autre osmo-tolérante. Le comportement des deux isolats vis-à-vis ce type de molécules permettra d'évaluer leur utilité et le risque d'apparition de souches résistantes.

Le principe de cette méthode est de confronter le fongicide et le champignon sur un support artificiel (Henni, 1987). La sensibilité de ces isolats est testée *in vitro* par inclusion des fongicides aux milieux de cultures. Les matières actives sont mises en suspension dans de l'acétone ou l'eau distillée stérile (en fonction des molécules), elles sont diluées jusqu'à obtention des concentrations déterminées par addition au milieu PSA en surfusion à 45°C . Après solidification, un disque mycélien de 5 mm de diamètre est prélevé à partir de cultures

âgées de sept à dix jours sur milieu PSA, puis placé au centre des boîtes contenant le milieu PSA-fongicide et le milieu PSA amendé d'acétone comme témoin.

Tableau 13: Matières actives testées et synthétisées au laboratoire de chimie organique appliqué de l'Université d'Oran.

Matière active	Formule chimique
MA1	N-phenyl-O-prorargyl carbamate
MA2	Crotyl-N-phenyl urethane
MA3	O-allyl-N-phenyl carbamate
MA4	2-chloro-2-(dodecylthio)-acetonitrile
MA5	$C_4H_6MnN_2S_4$
MA6	$C_4H_4-N-C_3H_3-S$
MA7	$C_5H_8N_2ZnS_4$
MA8	1(P-nitrophenyl)-1,2,3 triazol-4-methyl phenyl carbamate
MA9	$(C_4H_6MnN_2S_4)_x(Zn)_y$

L'efficacité de ces molécules, utilisés en concentrations comprises entre 50 et 500 ppm est testé en regardant leur effet sur la croissance mycélienne. Après six jours d'incubation à 25°C à l'obscurité, on remarque parfois un secteur de résistance champignon-fongicide qui disparaît après dix jours sous le mycélium. Pour chaque espèce fongique et chaque concentration de fongicide, trois répétitions sont effectuées.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne par rapport au témoin est calculé et la sensibilité de chaque isolat est ensuite estimée par le calcul des CI_{50} (concentration inhibant la croissance de 50%) correspondantes, elles sont déterminée graphiquement à partir de la relation entre le logarithme décimal de la concentration en fongicide (en abscisses) et des valeurs issues des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne (en ordonnées).

Le pourcentage d'inhibition se calcule selon la formule suivante (Atrassi *et al.*, 2007) :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = [(\text{Diamètre du témoin} - \text{Diamètre du test}) / \text{Diamètre du témoin}] \times 100$$

Clicomhs.com



Chapitre 3 :
Résultats et Discussions



I. Etude épidémiologique

1. Echantillonnage et fréquence des isolements

Le but de la recherche est de déterminer l'intensité de la brûlure hâtive sur les tomates et pommes de terre cultivées dans différentes régions à maraichage intensif de l'ouest Algérien pendant la période 2011-2013. L'incidence de l'alternariose est évaluée par l'isolement des champignons à partir des tissus infectés, représentant des symptômes typiques de la maladie. Nous avons recueilli 989 échantillons et déterminé la présence de différents champignons.

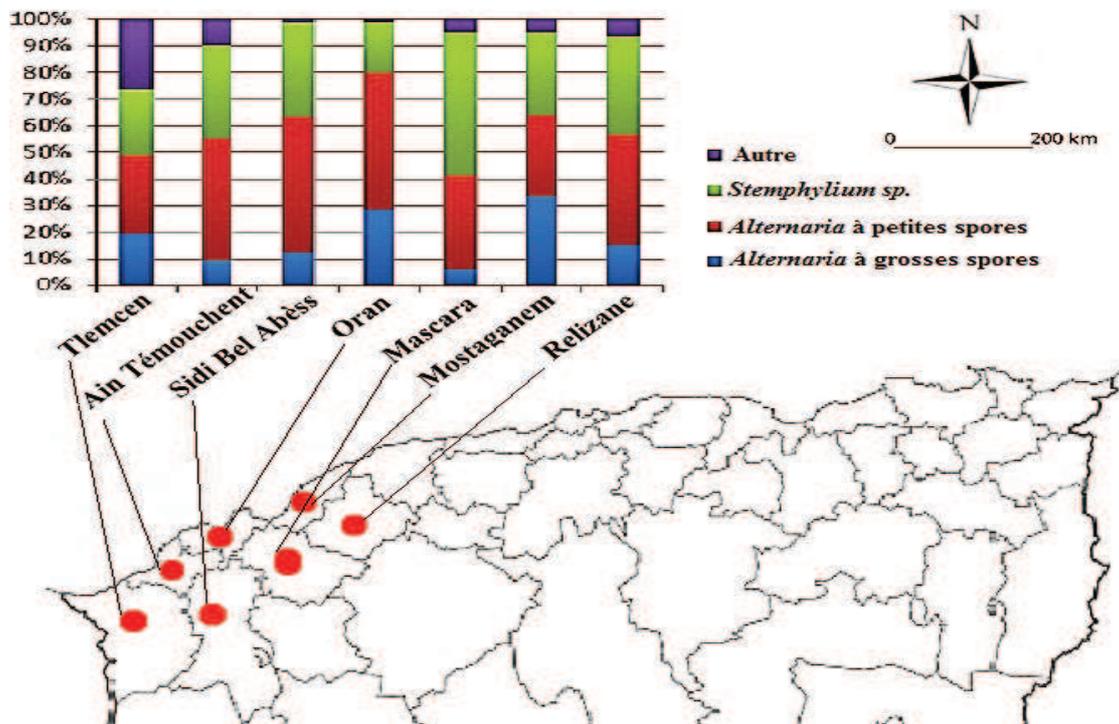


Figure 17: Fréquence de l'isolement dans les Wilaya du Nord-Ouest Algérien.

La fréquence de l'apparition des *Alternaria sp.* à grosses et petites spores, a montré des différences, elles ont été isolées à partir de la majorité des échantillons collectés. Un grand pourcentage de ces lésions contenait les espèces à petites spores (figure 18). La problématique des évaluations sur le terrain concernant les espèces de la section *alternata*, est la concentration naturellement élevée du champignon dans l'air (Maya-Manzano *et al.*, 2012). Aussi, les spores du champignon sont un allergène connu pour les réactions de la fièvre des foins. Ainsi, en raison de cette forte concentration, *A. alternata* est souvent trouvée dans les lésions causées par des pathogènes ou des dommages physiologiques.

Les données présentées dans la figure (17) révèlent que l'incidence de l'alternariose varie sur les sites étudiés ; nous avons remarqué une incidence maximale de la maladie à Oran (79,63%), suivie par Mostaganem (63,79%), Sidi Bel Abès (63,50%), Relizane (56,33%) et Ain Témouchent (54,91%), une incidence moyenne de la maladie de 49% est signalée à Tlemcen, suivie par Mascara (41,28%). D'autre part, la comparaison globale entre les différentes Wilaya enquêtées, l'incidence de la maladie élevée de 63,79% enregistrée à Mostaganem qui est à égalité avec celle de Sidi Bel Abès (63,50%).

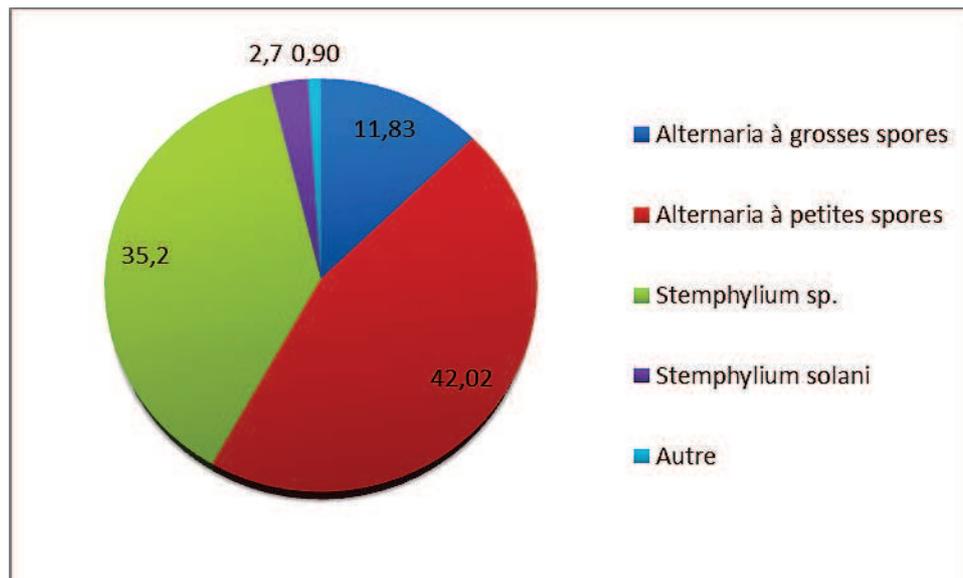


Figure 18: Les principaux agents de la brûlure foliaire des *Solanacées* isolés dans les Wilayas du Nord-Ouest Algérien.

En effet, dans les sites étudiés, nous avons observé que parmi les maladies de la brûlure foliaire les plus répandues sur les cultures de *Solanacées*, l'alternariose représente une incidence de 53,86%. Celle provoquée par les espèces à petites spores, comme *A. alternata* (Fr.) Keissler, *A. tenuissima* (Kunze) Wiltshire, et *A. arborescens* (EG Simmons), avec une moyenne de 42,02%. L'incidence de la maladie causée par les espèces à grosses spores (*Alternaria solani* Sorauer, *A. tomatophila* EG Simmons) est de 11,83%. Ainsi, plusieurs espèces du genre *Alternaria* sont isolées. Par ailleurs, nous avons constaté que les symptômes sont observés en premier lieu sur les feuilles inférieures matures et qui finalement se propagent sur les feuilles supérieures et atteignent ensuite la tige, le calice et le fruit. Toutefois, dans la région de Sidi Bel Abbès pendant les prospections de la mi-août 2013, des symptômes similaires à l'alternariose sont observés sur *Datura stramonium*. Par ailleurs, sur les cultures de tomates, la plupart des infections de fruits ont commencé à partir de l'extrémité

du pédoncule lié à la tige infectée et conduisent à l'abscission des fruits avant maturation. Fontem (1993) a constaté que des variétés majoritairement cultivées au Cameroun telles que Saint- Pierre, Heinz 1370, Roma VF, et Marmande sont toujours atteintes avec des symptômes aigus de l'alternariose. Il a remarqué aussi, que l'infection est moins fréquente en saison estivale, mais dans les cultures mal entretenues, les infections précoces aboutissent à une perte totale de fruits. D'autre part, d'après Vloutoglou *et al.* (2000) la brûlure foliaire de la tomate est majoritairement causée par *A. solani* et a le potentiel de devenir l'une des maladies les plus graves dans les régions productrices de tomate en Grèce.

Selon les résultats de notre étude (tableau 14), on peut affirmer que :

- La Stemphyliose est la deuxième maladie la plus répandue de la brûlure foliaire, en effet, dans les champs inspectés, l'intensité moyenne est estimée à 35,20 %. De plus, les symptômes graves sont rencontrés sur le feuillage et les fruits. Au cours de l'étude préliminaire, les espèces appartenant au genre *Stemphylium* étaient observées fréquemment et associées à des lésions sur les feuilles de *Solanacées* qui sont couramment reconnues comme symptômes de la brûlure foliaire. Les échantillons de feuilles de pommes de terre et de tomate ont des lésions caractéristiques communes ou peu semblables à ceux causés par une infection d'*Alternaria sp.* Ainsi, l'observation des spores sur les cultures issues des isollements a révélé un mélange d'espèces appartenant aux genres *Alternaria* et *Stemphylium*. Il faut noter que les nécroses provoquées par *Stemphylium solani* (Weber) sont aussi rencontrées sur feuillage des *Solanacées* et majoritairement sur fruits de tomates avec une incidence moyenne de 2,70 %.

- La maladie du mildiou (*Phytophthora infestans*) est observée avec une incidence moyenne de 0,97%, les régions les plus atteintes sont : Mascara (Kouir 5,88%) sur cultures de pommes de terre, Sidi Belabesse (Zlifa 7,69%), ainsi que Tlemcen (Oued Tafna 6,25%) sur cultures de tomates. Des symptômes graves sont observés majoritairement sur bourgeons, tiges et feuillages. Au cours de l'enquête, il y avait des cas de perte totale de cultures de tomate attribuable au mildiou.

- L'incidence de la fusariose est aussi fréquente dans les domaines étudiés avec une incidence moyenne de 1,55 %; sur les champs infectés par *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyd & Han. Tandis que *Penicillium sp.* sont observées avec une moyenne de 3,57%, ce champignon est plus répandu dans les cultures cultivées en tunnels comme à Tlemcen (Oued Tafna 43,7% et Remchi 14,2%) et à Mascara (Hassine 16%).

- D'autres maladies sur feuillage sont observées avec une prévalence moyenne inférieure à

0,7% (figure 18). Des taches brunes causée par *Ulocladium sp.*, *Chaetomium sp.* et *Bipolaris sp.* sont isolés à partir de 0,32% ; 0,35% et 0,15 % des échantillons respectivement.

- Les pourritures des fruits de tomate sont observées dans tous les champs au stade de la fructification et maturation. Nous avons observé aussi des agents liés à la pourriture molle comme *Rhizopus nigricans* et *Aspergillus sp.* avec une incidence de 0,72% et 0,36 % respectivement. Enfin, la pourriture grise causée par *Botrytis cinera* a eu lieu avec 0,06%. En définitive, ces résultats indiquent que de nombreux agents pathogènes sont associés à la détérioration des cultures de *Solanacées*. D'ailleurs, des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs. Fontem (1993) a signalé neuf maladies affectant les fruits de tomate au Cameroun, il indique parmi les plus importantes d'entre elles la pourriture aqueuse, la pourriture grise, la pourriture molle bactérienne et des symptômes de moisissures noires et grises. Aussi, Morris *et al.* (2000) ont trouvé que 76 % des fruits de tomate destinés à la transformation ont été affectés avec la maladie de la tache noire (Black spot) causée par *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler en Californie. De même, Ikhou (2011) a identifié six espèces fongiques à savoir ; *Alternaria alternata*, *A. tenuissima*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum* et *Thrichoderma sp.* comme les principaux agents responsables de la détérioration des fruits de tomates commercialisées en Algérie notamment dans les marchés de Mostaganem, Biscra, Oran, Mascara et Alger.

Tableau 14: fréquence de l'isolement des principaux agents associés à la détérioration des *Solanacées* en (%)

Régions		<i>A. solani</i>	<i>A. alternata</i>	<i>Stemphylium</i> sp.	<i>Stemphylium</i> <i>solani</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Ulocladium</i> sp.	<i>Phytophthora</i> sp.	<i>Embellisia</i> sp.	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Botrytis</i> <i>cinerea</i>
Oran	Bir El Djir	17,8	50,12	21	0	0	3,52	0,4	0	0	7,16	0	0	0
	Djbel Lekhar	0	70	25	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
	Hassi Bounif	38,4	51,5	10,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hassi Ben Okba	26,6	65	6,8	0	1,6	0	0	0	0	0	0	0	0
Ain Témouchent	Sidi Ben Adda 1	10,55	38,75	50,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sidi Ben Adda 2	15,65	38,55	15,35	7,69	20,07	0	0	0	2,69	0	0	0	0
	Rechgoune	2,4	69,1	23,45	1,23	1,23	0	0	1,23	1,23	0	0	0	0
	Terga	0	50,02	48,7	0	0	1,28	0	0	0	0	0	0	0
	Ain Tolba	0	40,92	40,9	0	0	0	0	0	0	0	18,18	0	0
Sidi Bel Abess	Ain Elberd	0	44,8	50,1	0	0	1,7	0	0	0	1,7	0	0	1,7
	Zlifa 1	23,5	52,5	14,7	0	5,88	0	2,94	0	0	0	0	0	0
	Zlifa 2	1,1	59,5	35	0	0	0	0	3,37	0	0	0	0	0
	Zlifa 3	0	50	40,3	0	0	0	1,92	7,69	0	0	0	0	0
Mostaganem	Stidia	22,5	41,9	32,2	3,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hassi Mamache	33,3	37,5	25	4,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mazaghrane	44	12	24	16	0	4	0	0	0	0	0	0	0
	Ouriah	0	30,7	69,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tlemcen	Walhassa	14,2	35,7	43	7,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Maghnia	0	40	48	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	Remchi	25	21,4	39,2	0	0	14,2	0	0	0	0	0	0	0
	Oued Tafna	0	12,5	37,5	0	0	43,7	0	6,25	0	0	0	0	0
Mascara	Tizi	0	30	60	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0
	Kouir	5,8	35	52,9	0	0	0	0	5,88	0	0	0	0	0
	Hassine	0	32	48	0	0	16	0	0	0	0	0	4	0
Relizane	Oued Rhiou	15,07	41,26	19,04	18,25	3,17	0	3,17	0	0	0	0	0	0

2. Diagnostic moléculaire

Le niveau de sensibilité de la technique de diagnostic pour la détection et la quantification du pathogène sur milieu de culture classique est confronté à une problématique de faux négatif, car les espèces saprophytes ont tendance à envahir la surface des tissus lors des isollements inhibant ainsi le développement des espèces pathogènes. C'est la raison pour laquelle des analyses complémentaires par PCR sont effectués sur 93 échantillons (tableau 15). La détection d'*A. tomatophila* est réalisés par le couple d'amorces spécifiques (OATf4/R2) et celle d'*A. solani* par le couple d'amorces spécifiques (OAsF7/R6). Le groupe d'espèces à petites spores (*A. arborescens*, *A. alternata* et *A. tenuissima*) est détecté par le couple d'amorces (AAF2/R3) pour la confirmation l'étude épidémiologique.

Tableau 15: Diagnostic par PCR des espèces d'*Alternaria* dans les échantillons de tissus infectés.

Code	Origine de l'échantillon	Amplification PCR			
		ITSF1/ITS 4	AAF2/AAR 3	OATf4/OAtR 2	OAsF7/OAs R6
C1	Bir El Djir - Oran	+	+++	-	-
C2	Bir El Djir - Oran	+	++	+	-
C3	Bir El Djir - Oran	++	+++	-	-
C4	Bir El Djir - Oran	++	+++	+	-
C5	Bir El Djir - Oran	+	-	-	-
C6	Bir El Djir - Oran	+	+	-	-
C7	Bir El Djir - Oran	++	+++	-	-
C8	Bir El Djir - Oran	+	+++	-	-
C9	Bir El Djir - Oran	+++	+++	-	-
C10	Bir El Djir - Oran	++	+++	-	-
Co	Bir El Djir - Oran	+++	+++	++	-
Cod	Bir El Djir - Oran	+	-	-	-
S1a	Stidia 1- Mostaganem	+++	+	-	-
S1b	Stidia 1- Mostaganem	+	++	-	-
S1c	Stidia 1- Mostaganem	++	+++	-	-
S2b	Stidia 2- Mostaganem	+	++	+	-
S2c	Stidia 2- Mostaganem	+	++	-	-
O1	Oouriah- Mostaganem	+	+++	-	-
O2	Oouriah - Mostaganem	++	+	-	-
O3	Oouriah - Mostaganem	+	++	-	-
O4	Oouriah - Mostaganem	++	+++	+	-
H1	Mamache - Mostaganem	++	+++	-	-
H2	Mamache - Mostaganem	+	++	-	+
H3	Mamache - Mostaganem	+	-	-	++
H4	Mamache - Mostaganem	++	++	-	-
Mz1	Mazaghrane - Mostaganem	++	++	-	-
Mz2	Mazaghrane - Mostaganem	++	-	+	-
Mz3	Mazaghrane - Mostaganem	+	-	++	-
Mz4	Mazaghrane - Mostaganem	+	++	-	-
Mz5	Mazaghrane - Mostaganem	+	+	+	-
Mz6	Mazaghrane - Mostaganem	+	++	-	-
MH1	Hassine - Mascara	+++	+++	-	-
MH2	Hassine - Mascara	++	++	-	-

MK1	Kourir - Mascara	+	++	-	-
MK2	Kourir - Mascara	++	+	-	-
MK3	Kourir - Mascara	+	+	-	+
MT1	Tizi - Mascara	+	-	-	-
MT2	Tizi - Mascara	+	-	-	-
MT3	Tizi - Mascara	++	++	-	-
R1	Remchi - Tlemcen	+++	-	+	-
R2	Remchi - Tlemcen	+++	+	-	-
R3	Remchi - Tlemcen	+++	-	+	-
R4	Remchi - Tlemcen	+++	-	++	-
R5	Remchi - Tlemcen	+	-	-	-
R6	Remchi - Tlemcen	+++	+	-	-
R7	Remchi - Tlemcen	-	-	-	-
SB1	Ain Elberd 3- Sidi Bel Abbès	+	++	-	-
SB1c	Ain Elberd 3- Sidi Bel Abbès	+	+	-	-
SB1d	Ain Elberd 3- Sidi Bel Abbès	+	+	-	-
SB2	Zlifa 1 - Sidi Bel Abbès	+	++	-	-
SB2b	Zlifa 1 - Sidi Bel Abbès	+	+	-	-
SB2c	Zlifa 1 - Sidi Bel Abbès	+	++	+	-
SB3	Zlifa 2 - Sidi Bel Abbès	++	+++	-	-
SB3b	Zlifa 2 - Sidi Bel Abbès	+	++	-	-
SB4	Zlifa 3 - Sidi Bel Abbès	+++	+	-	-
SB4	Zlifa 3 - Sidi Bel Abbès	+	++	-	-
SB4b	Zlifa 3 - Sidi Bel Abbès	+	-	-	-
SB4c	Zlifa 3 - Sidi Bel Abbès	+	+	-	-
SB5	Ain Elberd 1- Sidi Bel Abbès	++	++	-	-
SB5b	Ain Elberd 1- Sidi Bel Abbès	+	-	-	-
SB5c	Ain Elberd 1- Sidi Bel Abbès	+	+	-	-
SB5d	Ain Elberd 1- Sidi Bel Abbès	+	+	-	-
SB6	Ain Elberd 2- Sidi Bel Abbès	+	-	-	-
SB6b	Ain Elberd 2- Sidi Bel Abbès	++	++	-	-
SB6c	Ain Elberd 2- Sidi Bel Abbès	+	++	-	-
At1a	Sidi Ben Adda 1- Ain Témouchent	+++	-	-	+
At1b	Sidi Ben Adda 1- Ain Témouchent	+++	-	-	-
At1c	Sidi Ben Adda 1- Ain Témouchent	+++	+	-	-
At1d	Sidi Ben Adda 1- Ain Témouchent	+++	++	-	-
At1e	Sidi Ben Adda 1- Ain Témouchent	+++	+	-	-
At2	Sidi Ben Adda 2- Ain Témouchent	+	-	-	-
At2a	Sidi Ben Adda 2- Ain Témouchent	+++	-	-	-
At2b	Sidi Ben Adda 2- Ain Témouchent	+	++	-	-
At2c	Sidi Ben Adda 2- Ain Témouchent	+	++	-	-
At2d	Sidi Ben Adda 2- Ain Témouchent	++	++	-	-
At2e	Sidi Ben Adda 2- Ain Témouchent	+++	+++	+	-
At3	Terga - Ain Témouchent	+	++	-	-
At3	Terga - Ain Témouchent	-	-	-	-
At3b	Terga - Ain Témouchent	+	++	-	-
At3c	Terga - Ain Témouchent	++	+++	+	-
At4	Sidi Ben Adda 3- Ain Témouchent	+++	+++	-	-
At4b	Sidi Ben Adda 3- Ain Témouchent	+++	+++	-	-
At4c	Sidi Ben Adda 3- Ain Témouchent	+	++	-	-
At4d	Sidi Ben Adda 3- Ain Témouchent	+	++	+	-
At5	Rechgoune - Ain Témouchent	-	-	-	-
At5b	Rechgoune - Ain Témouchent	+	+	-	-
At5c	Rechgoune - Ain Témouchent	+	-	-	-
At5d	Rechgoune - Ain Témouchent	+	++	-	-
At5e	Rechgoune - Ain Témouchent	+	-	+	-
OJ1	Djebel Lekhar - Oran	+	++	-	-
RW	Oued Rhiou - Relizane	++	++	-	-

Wal	Walhassa - Tlemcen	+++	+	-	-
Wal	Walhassa - Tlemcen	+	++	-	-

(+++) Bon signal ; (++) Signal moyen ; (+) faible signal ; (-) pas de signal.

Durant les saisons de 2011- 2013, la présence des espèces appartenant à la section *alternata* dans les lésions s'est produite selon une incidence élevée de 67,26% (figure 19). *A. tomatophila* est détecté dans 17,2% des échantillons analysés. Dans la plus part des régions, *A. solani* manquait dans presque tous les échantillons de feuilles mis appart Mostaganem (Mamache), Mascara (Kouir) et Ain Témouchent (Sidi Ben Adda) le pathogène est détecté dans seulement 4,3% des échantillons. Des signaux positifs détectés par les amorces universelles spécifiques aux champignons ITS1/ITS4 ont permis de faire une estimation de l'incidence d'autres espèces (11,2%) dont aucun signal positif n'a été détecté par les autres amorces. Ces résultats confirment en partie le diagnostic effectué à partir des isolements sur milieu de culture et le complètent avec des données plus précises.

Les conditions météorologiques peuvent influencer sur le développement des espèces fongiques et favoriser le développement de celles appartenant à la section *alternata* qui sont principalement détectées dans les échantillons, ce qui confirme les résultats du diagnostic sur milieu de culture. Selon Viskonti et Chelkowski (1992), les conditions météorologiques peuvent influencer sur le développement des deux groupes d'espèces d'une manière différente lors de la propagation des conidies, le bec joue un rôle important dans leur libération et leur la dispersion, qui est principalement facilitée par l'augmentation de la vitesse du vent (Meredith, 1966 ; Pearson & Hall, 1975 ; Langenberg *et al.*, 1977 ; Rotem, 1994 ; Chou et Wu, 2002).

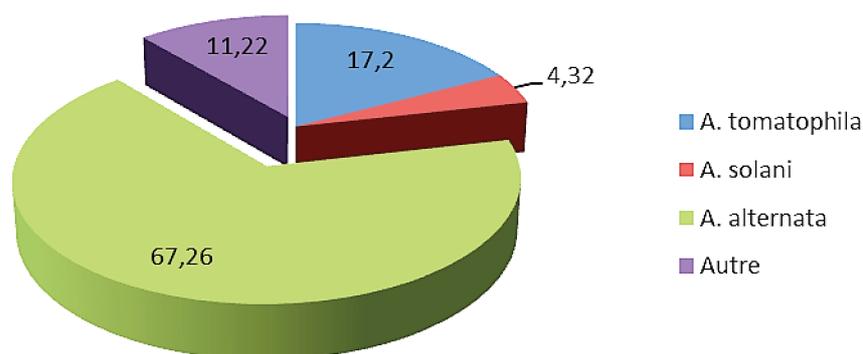


Figure 19: Incidence des principaux agents de l'alternariose des *Solanacées* détectés par PCR à partir des échantillons prélevés dans les Wilayas du Nord-Ouest Algérien.

Les méthodes basées sur la PCR ont permis la vérification de fragments d'ADN spécifiques aux espèces *Alternaria* à grosses spores. Bien que l'évaluation visuelle de la maladie a

seulement donné une idée de la répartition de l'épidémie de la maladie sur le terrain ; les tests PCR ont permis une évaluation spécifique d'*A. solani*, *A. tomatophila* et le groupe d'espèces à petites spores, ce test pourrait également être utilisé pour quantifier la maladie directement à partir l'ADN fongique dans les plantes infectées. D'ailleurs, les amorces spécifiques utilisés pour la détection et l'identification des espèces d'*Alternaria* à savoir ; (OAsF7/R6) (OAtF4/R2) et (AAF2/R3) ont généré des signaux fluorescents à intensités différentes. Ainsi, les produits de PCR d'environ 164pb (figure 20 A.), 438pb (figure 20 B.) et 341pb (figure 20 C.) sont détectés dans les échantillons de feuilles infectées pour chaque couple d'amorce respectivement. Selon les résultats obtenus, et dans la majorité des cas, ces amorces sont sensibles pouvant différencier entre les espèces *Alternaria*. De plus, la confirmation de la présence dans les plantes malades des espèces *A. solani*, *A. tomatophila* et celles à petites spores à savoir ; *A. arborescens*, *A. alternata* et *A. tenuissima*, est effectuée par extraction de l'ADN de ces espèces à partir de cultures pures ; Ainsi, un signal simple clair est amplifié à partir de celles-ci servant de témoin positif (figure20).

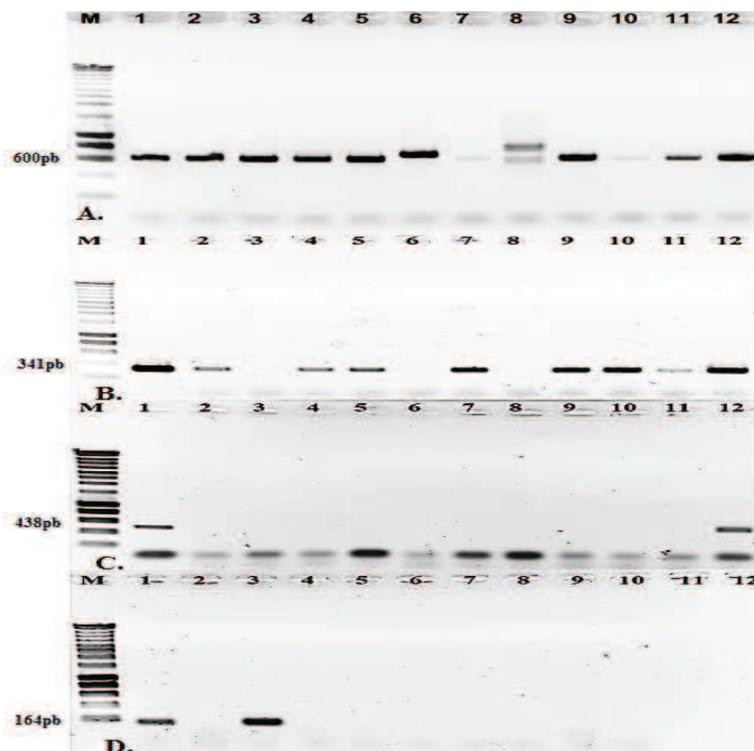


Figure 20: Détection des *Alternaria* sp. dans les tissus infectés de *Solanacées* collectés dans différentes régions. Pistes 2 :OJ1; 3 : H3; 4 :Wal; 5 :MZ4; 6 :AT1a; 7 :MH1; 8 :C5; 9 :SB3; 10 :AT3c; 11 :RW; 12 : CO. **A.** amplification avec les amorces ITSF1/4 ; **B.** Amplification avec les amorces spécifiques du groupe d'espèces *A. alternata* (AAF2/R3). Piste 1 : témoin positif (souche 165) ; **C.** Amplification avec les amorces spécifiques à *A. tomatophila* (OAtF4/R2). Piste 1 : témoin positif (souche 198) ; **D.** Amplification avec les amorces

spécifiques à *A. solani* (OAsF7/R6). Piste 1 : témoin positif (souche 266). M= marqueur de taille.

Les résultats obtenus durant cette période ont montré que sur plantes de tomates, de nombreux symptômes ne sont pas causés que par *A. tomatophila*, mais aussi par *A. solani* ce qui est en contradiction avec les observations de Simmons (2007) qui a montré que *A. solani* est l'agent pathogène lié uniquement à la brûlure foliaire des pommes de terre, à l'inverse nos résultats s'avèrent en accord avec ceux de Kumar *et al.* (2013) et leurs travaux sur la détection moléculaire de *A. solani* sur plantes de tomates. Lourenço *et al.* (2009) ont prouvés l'existence de preuves solides que la sous-population d'*A. solani* provoquant la brûlure foliaire chez la pomme de terre est génétiquement distincte de la sous-population pathogène de la tomate.

Les résultats obtenus concordent avec ceux de Gannibal *et al.* (2013 et 2014) qui ont utilisé les mêmes amorces pour la détection et l'identification des *Alternaria sp.* sur *Solanacées*. Récemment, Pavóna *et al.* (2012) ont élaboré une méthode de détection par PCR d'*Alternaria spp.*, dans des échantillons de tomates commercialisées brutes et transformées sur la base de l'espaceur interne transcrit (ITS) et d'un marqueur génétique. Ces méthodes rapides, sensibles et fiables pour l'évaluation de la population de l'agent pathogène ou de la charge d'inoculum deviennent cruciales pour une gestion efficace de la maladie avec un gain de temps. Actuellement en Algérie, le diagnostic de l'alternariose est effectué par des méthodes basiques. Ces tests couramment utilisés reposent sur l'évaluation visuelle des symptômes, la mesure du diamètre de la lésion et spores et l'intensité de la maladie (Bock *et al.*, 2010). La raison pour laquelle, des tests de PCR en temps réel ont été mis en œuvre pour la détection rapide d'agents fongiques phytopathogènes (Boedo *et al.*, 2008; Edin, 2012). Ces tests ont également été utilisés pour la quantification *in planta* des *Alternaria brassicicola* chez *Arabidopsis thaliana* (Brouwer *et al.*, 2003; Gachon et Saindrenan, 2004) et les graines de crucifères (Guillemette *et al.*, 2004). Récemment, une méthode a été également élaborée par PCR quantitative et par PCR en temps réel avec un ensemble d'amorces conçues à partir des régions codantes pour la β -tubuline pour la détection rapide d'*A. solani* sur tomate (Kumar *et al.*, 2013). En conséquence, la détection spécifique et rapide est très importante afin de surveiller et quantifier la présence d'agents phytopathogènes pour une gestion efficace des maladies des plantes. Ainsi, ces méthodes moléculaires constituent donc grâce à leur grande sensibilité potentielle, un progrès significatif à cet égard (Lepoivre, 2003).

La présente étude indique que l'incidence de la maladie varie selon les régions. Cela peut être associé à des facteurs environnementaux et / ou pathogènes qui prévalent. En effet, selon van der Walls *et al.* (2003), les variations des conditions météorologiques et de la quantité d'inoculum initial d'*Alternaria*, peuvent être responsables des intensités changeantes de la maladie à différents endroits. De plus, la variation des facteurs environnementaux comme la température, la durée de l'humidité et l'humidité relative sont susceptibles d'affecter le développement de la brûlure foliaire chez les *Solanacées* (Harrison *et al.*, 1965; Adams et Stevenson, 1990; Fontem, 1993; Vloutoglou et Kalogerakis, 2000). En effet, l'eau sous la forme d'humidité relative élevée, les précipitations ou l'accumulation de rosée, peut augmenter la germination des conidies et l'infection par le pathogène (Rotem, 2004). Cette situation s'applique au climat méditerranéen qui couvre le nord Algérien. Selon Snoussi (2009), cette zone est la plus humide d'Algérie, elle est caractérisée par des précipitations annuelles qui varient entre 400 et 1 000 mm d'eau. Cependant, il est noté que l'alternance des conditions d'humidité faible et élevée favorisent le développement de la maladie (Van der - Walls *et al.*, 2001). Ces observations concordent avec les résultats de Duhan et Suhag (1990), Hilal et Kamal (1990), Fazal *et al.* (1994), Rotem (1994), Anastasia *et al.* (1998), Dillard *et al.* (1998), Ghosh *et al.* (2009) et Ganie *et al.* (2013). Toutefois, une incidence inférieure de la maladie dans certains champs pourrait être attribuée à dose équilibrée d'engrais, un grand espacement outre l'élimination rapide des débris de culture. Ces observations sont en accord avec les conclusions de Duhan et Suhag (1990).

II. Identification morphologique et étude des caractères cultureux

1. Isolement et purification de l'agent pathogène

Différents pathogènes sont isolés à partir des échantillons infectés de *Solanacées* et d'autres plantes provenant de différentes localités des wilaya d'Ain Témouchent, Mascara, Mostaganem, Oran, Sidi Bel Abès, Relizane et Tlemcen.

La collection est représentée par 235 souches purifiées et conservées appartenant aux espèces d'*Alternaria* pathogènes et saprophytes ainsi que des souches de *Stemphilium*, *Ulocladium* et *Bipolaris*. L'ensemble des souches et leur origine sont représentés dans le tableau (16) avec une indication du type d'utilisation qui en a été fait (tests physiologiques, identification moléculaire et pouvoir pathogène).

Les souches de référence CBS102605 (*Alternaria arborescens*) et 5983 (*Alternaria alternata*) sont issues de la collection du laboratoire FUNGISEM UMR-PaVé77 de l'Université d'Angers, France.

Tableau 16: L'hôte et l'identification morphologique des souches isolées utilisés dans chaque analyse au cours de cette étude et l'identification moléculaire ultérieure.

Isolat	Hôte	Organe	Lieu de prélèvement	Date	Espèce	Pouvoir pathogène	Code Etude physiologique	identification moléculaire
1	Tomate	Fruit	Mostaganem - site 1	23/03/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A10)	+
2	Tomate	Fruit	Mostaganem - site 2	23/03/2011	<i>A. alternata</i>	-	-	+
3	Tomate	Fruit	Mostaganem - site 2	23/03/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
4	Pomme de terre	Feuille	Mostaganem - site 3	23/03/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
8	Pois	Feuille	Hassi Bounif - Oran	10/05/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+
10	Pomme de terre	Feuille	Djebel Lekhar - Oran	24/05/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
11	Pomme de terre	Feuille	Djebel Lekhar - Oran	24/05/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
14	Tomate	Tige	Hassi Bounif - Oran	26/05/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
15	Tomate	Tige	Hassi Bounif - Oran	26/05/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
18	Tomate	Feuille	Hassi Bounif ITCMI - Oran	06/06/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
19	Pomme de terre	Feuille	Hassi Bounif ITCMI - Oran	06/06/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	+
20	Pomme de terre	Feuille	Hassi Bounif ITCMI - Oran	06/06/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
21	Tomate	Feuille	Hassi Bounif ITCMI - Oran	06/06/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
22	Tomate	Feuille	Hassi Bounif ITCMI - Oran	06/06/2011	<i>A. alternata</i>	+	+(A21)	+
23	Tomate	Tige	Hassi Bounif ITCMI - Oran	06/06/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
24	Pomme de terre	Feuille	Hassi Bounif ITCMI - Oran	06/06/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
26	Poivron	Fruit	Sidi Ben Okba - Oran	20/07/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	+
27	Tomate	Feuille	Sidi Ben Okba - Oran	20/07/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	+
28	Aubergine	Feuille	Sidi Ben Okba - Oran	20/07/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
29	Aubergine	Feuille	Sidi Ben Okba - Oran	20/07/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
30	Tomate	Feuille	Djebel Lekhar - Oran	20/07/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
31	Tomate	Feuille	Djebel Lekhar - Oran	20/07/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
32	Tomate	Feuille	Sidi Ben Okba - Oran	20/07/2011	<i>A. alternata</i>	+	+(A26)	+
34	Poivron	Feuille	Sidi Ben Okba - Oran	20/07/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
36	poivron	Fruit	Mostaganem	26/07/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
38	tomate	Fruit	Mostaganem	28/07/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A11)	+
41	Chou	Feuille	Tatba - Alger	28/07/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
42	Chou	Feuille	Tatba - Alger	28/07/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+
45	Tomate	Feuille	Stidia 1 - Mostaganem	15/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A25)	+
46	Tomate	Feuille	Stidia 1 - Mostaganem	15/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
47	Tomate	Feuille	Stidia 1 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+

49	Tomate	Feuille	Ouriah - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
51	Tomate	Fruit	Ouriah 1 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
52	Tomate	Fruit	Ouriah 1 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
53	Pomme de terre	Feuille	Mamache 1 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+
54	Pomme de terre	Feuille	Mamache 1 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
55	Pomme de terre	Tige	Mamache 1 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
56	Pomme de terre	Tige	Mamache 1 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
57	Pomme de terre	Feuille	Mamache 2 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+
58	Pomme de terre	Feuille	Mamache 2 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
59	Pomme de terre	Feuille	Mamache 2 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
60	Haricot	Feuille	Stidia - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
65	Tomate	Tige	Stidia 2 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. arborescens</i>	+	+(A23)	+
66	Tomate	Tige	Stidia 2 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
67	Tomate	Fruit	Ouriah 2 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
68	Tomate	Feuille	Stidia 2 -Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
69	Tomate	Feuille	Stidia 2 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	-
70	Pomme de terre	Feuille	Mamache 3 – Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
71	Pomme de terre	Tige	Mamache 3 – Mostaganem	20/09/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+
72	Aubergine	Feuille	Mamache - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
73	Aubergine	Feuille	Mamache - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
75	Aubergine	Feuille	Mamache - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
76	Pomme de terre	Feuille	Mamache 1 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
77	Pomme de terre	Feuille	Mamache 3 – Mostaganem	20/09/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+
78	Tomate	Fruit	Ouriah - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
79	Tomate	Feuille	Ouriah - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. alternata</i>	+	+(A4)	+
81	Tomate	Feuille	Ouriah - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
82	Tomate	Feuille	Stidia 2 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A6)	+
83	Tomate	Feuille	Stidia 2 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	-
84	Tomate	Feuille	Stidia 2 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. alternata</i>	+	+(A8)	+
85	Tomate	Feuille	Stidia 2 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+
86	Tomate	Feuille	Stidia 1 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
87	Tomate	Tige	Stidia 1 - Mostaganem	20/09/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
89	Aubergine	Pédoncule	Biskra	09/10/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
90	Aubergine	Fruit	Biskra	09/10/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
91	Aubergine	Pédoncule	Biskra	09/10/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
97	Tomate	Feuille	Bir El Djir - Oran	14/11/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+
98	Laitue	Feuille	Kouir - Mascara	14/11/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
99	Pomme de terre	Feuille	Kouir 1 - Mascara	14/11/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
100	Pomme de terre	Tige	Kouir 1 - Mascara	14/11/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+

102	Pomme de terre	Feuille	Kouir 2 - Mascara	14/11/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
104	Pomme de terre	Feuille	Kouir 3 - Mascara	14/11/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
105	Pomme de terre	Tige	Kouir 3 - Mascara	14/11/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+
106	Pois	Feuille	Hassi Bounif - Oran	19/11/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+
107	Tomate	Fruit	Mostaganem	29/11/2011	<i>A. alternata</i>	+	+(A27)	+
109	Pomme de terre	Tubercule	Mascara	29/11/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
120	Tomate	Fruit	Mostaganem	29/11/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A22)	+
121	Tomate	Fruit	Mostaganem	29/11/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A9)	+
122	Tomate	Fruit	Mostaganem	02/12/2011	<i>Ulocladium sp.</i>	+	-	+
124	Carotte	Feuille	Mascara	05/12/2011	<i>A. radicina</i>	+	-	+
125	Tomate	Fruit	Mostaganem	07/12/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A7)	-
126	Tomate	Fruit	Mostaganem	07/12/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A16)	+
127	Tomate	Fruit	Mostaganem	07/12/2011	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
129	Pomme de terre	Feuille	Kouir 4 - Mascara	14/12/2011	<i>A. alternata</i>	+	+(A20)	+
130	Poivron	Feuille	Kouir - Mascara	14/12/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
131	Poivron	Tige	Kouir - Mascara	14/12/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+
132	Poivron	Fruit	Kouir - Mascara	14/12/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	-
135	Tomate	Feuille	Khesibia 1 - Mascara	14/12/2011	<i>A. alternata</i>	+	+(A18)	+
137	Pomme de terre	Feuille	kouir 5 - Mascara	14/12/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
138	Pomme de terre	Feuille	kouir 5 - Mascara	14/12/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
139	Pomme de terre	Feuille	Khesibia 1 - Mascara	14/12/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
140	Pomme de terre	Feuille	Khesibia 2 - Mascara	14/12/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A17)	+
141	Pomme de terre	Feuille	Khesibia 2 - Mascara	14/12/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+
142	Pomme de terre	Feuille	Khesibia 3 - Mascara	14/12/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+
143	Pomme de terre	Feuille	Khesibia 3 - Mascara	14/12/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+
150	Pomme de terre	Tige	Kouir 5 - Mascara	14/12/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A15)	+
151	Pois	Feuille	Mostaganem	15/12/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	-	-
153	Tomate	Feuille	Ain Témouchent site 1	16/12/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A1)	+
155	Tomate	Feuille	Ain Témouchent site 2	16/12/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A12)	+
156	Tomate	Feuille	Ain Témouchent site 2	16/12/2011	<i>A. alternata</i>	+	+(A3)	+
157	Tomate	Feuille	Ain Témouchent site 2	16/12/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A28)	-
161	Concombre	Feuille	Ain Témouchent	16/12/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+
164	Tomate	Feuille	Ain Témouchent site 1	16/12/2011	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A14)	+
165	Pomme de terre	Feuille	Ain Témouchent site 2	16/12/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+
167	Tomate	Fruit	Mostaganem	26/12/2011	<i>A. alternata</i>	+	+(A30)	-
168	Tomate	Fruit	Mostaganem	26/12/2011	<i>A. alternata</i>	+	-	+
169	Tomate	Fruit	Mostaganem	26/12/2011	<i>A. alternata</i>	-	-	+
173	Tomate	Feuille	Bir El Djir - Oran	24/01/2012	<i>Ulocladium sp.</i>	+	-	+
174	Tomate	Fruit	Mostaganem	07/02/2012	<i>A. tenuissima</i>	+	-	-

175	Carotte	Feuille	Mascara	26/09/2012	<i>A. petroscelini</i>	-	-	+
177	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	02/10/2012	<i>A. alternata</i>	+	-	+
181	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	02/10/2012	<i>A. tenuissima</i>	-	-	+
182	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	02/10/2012	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
183	Tomate	Feuille	Hassi Bounif 2 - Oran	02/10/2012	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
184	Tomate	Feuille	Hassi Bounif 2 - Oran	02/10/2012	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
185	Tomate	Feuille	Hassi Bounif 3 - Oran	02/10/2012	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
186	Tomate	Feuille	Hassi Bounif 3 - Oran	02/10/2012	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
187	Tomate	Fruit	Hassi Ameer - Oran	02/10/2012	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
188	Tomate	Fruit	Hassi Ameer - Oran	02/10/2012	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
189	Tomate	Fruit	Hassi Ameer - Oran	02/10/2012	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
190	Tomate	Fruit	Hassi Ameer - Oran	02/10/2012	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
191	Tomate	Feuille	Hassi Ameer - Oran	02/10/2012	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-
194	Tomate	Feuille	Hassi Ameer - Oran	02/10/2012	<i>A. alternata</i>	+	-	+
198	Tomate	Feuille	Hassi Benokba - Oran	07/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
199	Tomate	Feuille	Hassi Benokba - Oran	07/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
200	Tomate	Feuille	Hassi Benokba - Oran	07/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
201	Tomate	Feuille	Hassi Benokba - Oran	07/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
202	Tomate	Feuille	Hassi Benokba - Oran	07/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
203	Tomate	Feuille	Hassi Benokba - Oran	07/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
204	Tomate	Feuille	Hassi Benokba - Oran	07/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
205	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	12/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
206	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	12/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
207	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	12/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
208	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	12/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
209	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	12/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
210	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	12/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	+(AT1)	+
211	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	12/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
212	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	12/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
213	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	12/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
215	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	17/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
216	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	17/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
217	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	17/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
218	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	17/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
219	Tomate	Tige	Hassi Bounif - Oran	17/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
220	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	17/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
221	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	04/05/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
222	Tomate	Feuille	Walhassa- Tlemcen	04/05/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
223	Tomate	Feuille	Walhassa- Tlemcen	04/05/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
229	Tomate	Feuille	Walhassa- Tlemcen	05/05/2013	<i>A. alternata</i>	+	+(A2)	+
228	Tomate	Feuille	Hassi Bounif - Oran	12/04/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
230	Tomate	Feuille	Maghnia- Tlemcen	04/05/2013	<i>Stemphylium</i> <i>sp.</i>	-	-	+
231	Tomate	Feuille	Maghnia- Tlemcen	04/05/2013	<i>Stemphylium</i> <i>solani</i>	-	-	+
235	Tomate	Feuille	Bir El Djir - Oran	19/05/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	-

236	Tomate	Feuille	Bir El Djir - Oran	19/05/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	-
237	Pomme de terre	Feuille	Oued Rhiou- Relizane	30/05/2013	<i>A. solani</i>	-	-	+
240	Pomme de terre	Feuille	Oued Rhiou- Relizane	30/05/2013	<i>A. solani</i>	-	-	+
241	Tomate	Feuille	Stidia -Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
242	Tomate	Feuille	Stidia - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
243	Tomate	Feuille	Stidia -Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
244	Tomate	Feuille	Stidia - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
245	Tomate	Feuille	Stidia -Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
246	Tomate	Feuille	Stidia - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
247	Tomate	Feuille	Mamache - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. solani</i>	-	-	+
248	Tomate	Feuille	Mamache - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. solani</i>	+	-	+
249	Tomate	Feuille	Mamache - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. solani</i>	+	+(AS1)	+
250	Tomate	Feuille	Mamache - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. solani</i>	+	-	+
251	Tomate	Feuille	Mamache - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. solani</i>	-	-	+
252	Tomate	Feuille	Mamache - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. solani</i>	+	-	+
253	Tomate	Feuille	Mazaghrane - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
254	Tomate	Feuille	Mazaghrane - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
255	Tomate	Feuille	Mazaghrane - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
256	Tomate	Feuille	Mazaghrane - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
257	Tomate	Feuille	Mazaghrane - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
258	Tomate	Feuille	Mazaghrane - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
259	Tomate	Feuille	Mazaghrane - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
260	Tomate	Feuille	Mazaghrane - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
261	Tomate	Feuille	Mazaghrane - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
262	Tomate	Feuille	Mazaghrane - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
263	Tomate	Feuille	Mazaghrane - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
264	Tomate	Feuille	Mazaghrane - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	-
265	Tomate	Feuille	Mazaghrane - Mostaganem	24/06/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
266	Tomate	Feuille	Kouir - Mascara	02/07/2013	<i>A. solani</i>	+	+(AS2)	+
267	Tomate	Feuille	Kouir - Mascara	02/07/2013	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A19)	+
268	Tomate	Feuille	Mazaghrane - Mostaganem	24/06/2013	<i>Stemphylium solani</i>	-	-	+
269	Tomate	Feuille	Hassine- Mascara	02/07/2013	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A13)	+
270	Tomate	Feuille	Hassine - Mascara	02/07/2013	<i>A. alternata</i>	-	-	+
271	Tomate	Feuille	Tizi - Mascara	02/07/2013	<i>A. alternata</i>	+	+(A24)	+
272	Tomate	Feuille	Remchi- Tlemecen	06/07/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
273	Tomate	Feuille	Remchi- Tlemecen	06/07/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
274	Tomate	Feuille	Remchi- Tlemecen	06/07/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
275	Tomate	Feuille	Remchi- Tlemecen	06/07/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
276	Tomate	Feuille	Remchi- Tlemecen	06/07/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+

277	Tomate	Feuille	Remchi- Tlemecen	06/07/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
278	Tomate	Feuille	Remchi- Tlemecen	06/07/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
279	Tomate	Feuille	Ain Elberd 1- Sidi Bel Abbès	09/07/2013	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A5)	+
280	Tomate	Feuille	Ain Elberd 1- Sidi Bel Abbès	09/07/2013	<i>A. alternata</i>	-	-	+
281	Tomate	Feuille	Ain Elberd 2- Sidi Bel Abbès	09/07/2013	<i>A. tenuissima</i>	-	-	+
282	Tomate	Feuille	Ain Elberd 2- Sidi Bel Abbès	09/07/2013	<i>A. arborescens</i>	-	-	+
283	Tomate	Feuille	Ain Elberd 3- Sidi Bel Abbès	09/07/2013	<i>A. alternata</i>	-	-	+
284	Tomate	Feuille	Ain Elberd 3- Sidi Bel Abbès	09/07/2013	<i>A. alternata</i>	-	-	+
286	Tomate	Feuille	Bir El Djir- Oran	12/07/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
287	Tomate	Feuille	Bir El Djir- Oran	12/07/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
288	Tomate	Feuille	Bir El Djir- Oran	12/07/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
289	Tomate	Feuille	Bir El Djir- Oran	19/07/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
290	Tomate	Feuille	Bir El Djir- Oran	19/07/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
291	Tomate	Feuille	Bir El Djir- Oran	19/07/2013	<i>Bipolaris sp.</i>	-	-	+
292	Tomate	Feuille	Sidi Ben Adda- Ain Témouchent	13/08/2013	<i>A. solani</i>	+	-	+
293	Tomate	Tige	Sidi Ben Adda- Ain Témouchent	13/08/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
294	Tomate	Feuille	Zlifa site 1 - Sidi Bel Abbès	15/08/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	+(AT2)	+
295	Tomate	Tige	Zlifa site 2 - Sidi Bel Abbès	15/08/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
296	Tomate	Tige	Zlifa site 2 - Sidi Bel Abbès	15/08/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
297	Tomate	Tige	Zlifa site 2 - Sidi Bel Abbès	15/08/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
298	Tomate	Tige	Zlifa site 2 - Sidi Bel Abbès	15/08/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
299	Tomate	Tige	Zlifa site 2 - Sidi Bel Abbès	15/08/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
300	Tomate	Tige	Zlifa site 2 - Sidi Bel Abbès	15/08/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
301	Tomate	Tige	Zlifa site 3 - Sidi Bel Abbès	15/08/2013	<i>A. alternata</i>	-	-	+
302	Tomate	Tige	Zlifa site 3 - Sidi Bel Abbès	15/08/2013	<i>A. alternata</i>	+	-	+
303	Tomate	Feuille	Zlifa site 3 - Sidi Bel Abbès	15/08/2013	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A29)	+
304	<i>Datura Stramonium</i>	Feuille	Zlifa site 1 - Sidi Bel Abbès	15/08/2013	<i>A. crassa</i>	-	-	-
305	Tomate	Tige	Zlifa site 2 - Sidi Bel Abbès	15/08/2013	<i>A. solani</i>	-	-	+
306	Tomate	Tige	Sidi Ben Adda- Ain Témouchent	13/08/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
307	Tomate	Fruit	Mostaganem	19/08/2013	<i>A. tomatophila</i>	+	-	+
308	Tomate	Feuille	Sidi Ben Adda - Ain Témouchent	25/08/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
309	Tomate	Feuille	Sidi Ben Adda - Ain Témouchent	26/08/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
310	Tomate	Feuille	Rechgoune- Ain Témouchent	25/08/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
311	Tomate	Feuille	Rechgoune- Ain Témouchent	25/08/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	+
312	Tomate	Fruit	Relizane - Oued Rhiou	13/09/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	-

313	Tomate	Fruit	Relizane - Oued Rhiou	13/09/2013	<i>A. tenuissima</i>	+	+(A31)	+
314	Tomate	Fruit	Relizane - Oued Rhiou	13/09/2013	<i>A. solani</i>	-	-	-
315	Tomate	Fruit	Relizane - Oued Rhiou	13/09/2013	<i>A. solani</i>	-	-	-
316	Tomate	Fruit	Relizane - Oued Rhiou	13/09/2013	<i>A. tomatophila</i>	-	-	-
317	Tomate	Fruit	Relizane - Oued Rhiou	13/09/2013	<i>A. solani</i>	-	-	-
318	Tomate	Fruit	Relizane - Oued Rhiou	13/09/2013	<i>A. solani</i>	-	-	-
319	Tomate	Fruit	Relizane - Oued Rhiou	13/09/2013	<i>A. alternata</i>	+	+(A32)	+
320	Tomate	Fruit	Relizane - Oued Rhiou	13/09/2013	<i>A. solani</i>	-	-	-
321	Tomate	Fruit	Relizane - Oued Rhiou	13/09/2013	<i>A. solani</i>	-	-	-

2. Etude des caractères macroscopiques et microscopiques

2.1. Evaluation des caractères morphologiques macroscopiques

Trente-six isolats fongiques de différentes origines sont sélectionnés pour une caractérisation morphologique des colonies sur milieu pomme de terre de saccharose agar (PSA). Les résultats ont révélé une variation considérable entre les caractères macroscopiques des isolats (tableau 17). La couleur de la colonie varie du clair au foncé à une teinte olivâtre verdâtre à brune ou grisâtre. La majorité des colonies ont un aspect duveteux ou cotonneux, de légères variations de la croissance mycélienne avec des bordures régulière ou irrégulière, avec ou sans zones concentriques. Une couleur grise à brune avec des variantes clairement visible à partir de la face inférieure des colonies. Ces observations sont en accord avec ceux de Pusz *et al.* (2009) qui avaient reporté que la couleur des colonies d'*A. alternata* isolés d'*Amaranthus retroflexus* varie du gris clair au gris foncé. De même, Rai et Kumari *et al.* (2009) ont observé différents isolats d'*A. alternata*, les colonies avaient une texture cotonneuse à compacte et dense avec une couleur claire à noir foncé. Parmi les isolats à petites spores, une légère pigmentation jaunâtre du milieu PSA est observée chez l'isolat d'*A. arborescens*. Les résultats de Hubballi *et al.* (2010) ont montré une variation dans la pigmentation de quinze isolats d'*A. alternata* avec la production d'une pigmentation noire, brune-noire, marron et jaune.

Beaucoup de variations dans l'aspect des colonies chez les isolats à petites spores de la section *alternata* sont observées, elles sont représentées dans la figure (21). Dont la croissance mycélienne cotonneuse aérienne à moyenne parfois centrale. Ou encore un mycélium duveteux et/ ou avec des marges sillonnées ou compactes. Tandis que les souches à grosses spores présentent moins de variabilité point de vue macroscopique, la couleur du mycélium varie du gris clair au noir. Les isolats d'*A. tomatophila* produisent un mycélium subaérien et avec couleur plus claire par rapport à ceux d'*A. solani*, allant du gris clair au noir. Aucune variabilité n'est observée au sein des souches appartenant à l'espèce *A. solani*

contrairement aux souches d'*A. tomatophila* qui représentaient deux phénotypes ; gris claire et gris foncé (Figure 22). De même, Fraser (2002) a constaté les deux phénotypes d'*A. tomatophila* ; de couleur claire et celui de couleur foncée sur milieu PDA et que le phénotype clair était beaucoup plus virulent sur plante de tomate.

Tableau 17: Caractères Cultureux des isolats *Alternaria* sur milieu PSA.

Isolat	Colonies		Couleur de l'envers de	Sporulation ^e	
	Type ^a	Couleur			Bordures
A1	1	1	7	5	3
A2	2	2	7	1	3
A3	1	3	8	2	3
A4	3	4	4	4	3
A5	4	9	3	6	3
A6	3	4	1	1	3
A7	3	3	8	6	1
A8	3	8	3	4	3
A9	3	6	7	2	2
A10	3	9	7	5	3
A11	3	8	1	6	3
A12	1	6	1	5	3
A13	5	9	4	2	3
A14	1	1	1	2	3
A15	5	8	5	2	2
A16	3	8	7	5	3
A17	5	5	5	4	3
A18	5	1	6	7	3
A19	5	2	4	5	3
A20	5	8	6	1	3
A21	6	6	6	2	2
A22	3	2	8	1	3
A23	3	5	6	6	3
A24	5	1	1	7	3
A25	3	6	8	2	3
A26	6	7	5	2	3
A27	3	5	1	2	2
A28	1	5	7	3	3
A29	2	9	1	5	2
A30	3	8	2	3	3
A31	2	2	1	2	3
A32	2	1	7	7	3
AT1	6	7	7	7	1
AT2	3	10	9	8	1
AS1	8	10	8	8	1
AS2	8	10	8	8	1

^a**Type:** Duveteux, avec une croissance cotonneuse = type 1 ; Duveteux, légèrement sillonné = type 2 ; Cotonneux avec une périphérie légèrement compacte = type 3 ; Duveteux, légèrement sillonné de centre compact = type 4 ; Duveteux, apprimé = type 5 ; Cotonneux, subaérien = type 6 ; Mycélium apprimé à ras= 8. ^b **Couleur:** vert foncé olivâtre = 1 ; Vert olivâtre avec un centre foncé = 2 ; Vert clair = 3 ; Sombre au centre et vert olivâtre = 4 ; Vert foncé avec une surface grisâtre = 5 ; Vert olivâtre clair avec une surface grisâtre = 6 ; Gris foncé avec un centre blanc et surface grisâtre = 7 ; Vert olivâtre avec un centre gris clair = 8 ; Olivâtre avec centre brun et une surface grisâtre = 9 ; Grise foncée avec un fond noirâtre= 10. ^c **Bordures:** Irrégulier, compactes de couleur claire = 1 ; Irrégulière, avec des anneaux concentriques olivâtres clairs et gris = 2 ; Régulière avec une marge de couleur claire = 3 ; Régulière avec des anneaux concentriques, périphérie blanche ou grise = 4 ; Régulière, cotonneuse avec une périphérie de couleur claire = 5 ; Régulière avec une marge de couleur claire = 6 ; périphérie légèrement irrégulière de couleur claire = 7 ; Périphérie légèrement irrégulière de couleur claire et avec des anneaux concentriques = 8. Irrégulières légèrement compactes de couleur foncé= 9. ^d **Couleur de l'envers de la colonie:** Brune avec une marge grise claire = 1 ; Centre brun foncé avec une marge de couleur claire = 2 ; Grise foncé avec une marge grise claire = 3 ; Centre brun avec une marge de couleur claire = 4 ; Marge beige avec et centre brun foncé = 5 ; Grise claire avec un centre brun foncé = 6 ; Gris foncé = 7 ; Noirâtre= 8. ^e **Sporulation :** faible sporulation = 1 ; sporulation modérée = 2 ; bonne sporulation = 3

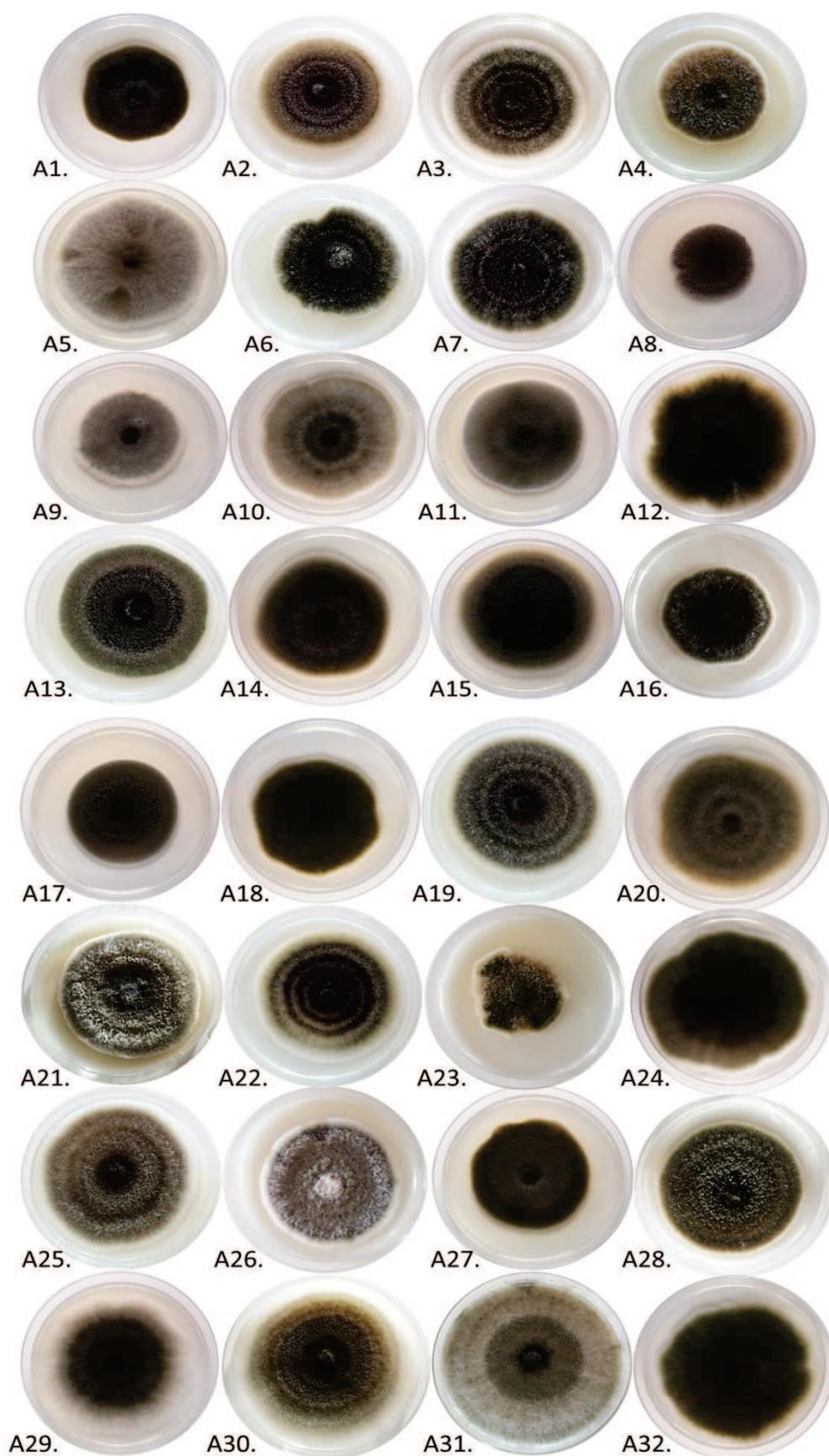


Figure 21: Aspect des colonies des souches à petites spores (section *alternata*) cultivées sur milieu PSA.



Figure 22: Aspect des colonies des souches à grosses spores (section *porri*) cultivées sur milieu PSA.

Les isolats d'*A. solani* et *A. tomatophila* produisent un pigment rouge-orangé ou jaune dans le milieu de culture, les mêmes observations ont été signalés avec Kumar *et al.* (2008). Aussi, Tong *et al.* (1997) ont étudié la biologie et la pathogénicité d'*A. solani* sur milieu PSA et sur plants de tomates, ils ont constaté qu'un pigment gris-brun et jaune était sécrété par certains isolats. Tous les isolats à petites spores ont produit des spores sur milieu PSA (Tableau 17) à l'exception des souches d'*A. tomatophila* (AT1 et AT2) chez lesquelles aucune sporulation n'est observée. Une sporulation élevée est observée chez l'isolat (A12), tandis que pour la plupart des isolats, une sporulation modérée est enregistrée. Une sporulation médiocre à nulle est observée chez les isolats (A7, AS1 et AS2). La variation des taux de croissance sur PSA est également observée (Figure 23). Le taux de croissance le plus élevé est obtenu pour l'isolat A31 (moyenne $14,90 \pm 0,614$ mm/jour) et le plus faible chez l'isolat (AS2) avec une moyenne de $0,67 \pm 0,51$ mm/jour. Les isolats dans la présente étude représentent des variations périodiques selon leur taux de croissance. Chez les isolats à petites spores, quatre ont progressé très rapidement dans les 2^{ème} et 4^{ème} premiers jours d'observation (A12, A13, A16 et A17), mais la croissance a diminué par la suite alors que la plupart des autres isolats avaient un taux de croissance optimal au 6^{ème} jour, l'isolat (A10) a progressé plus rapidement à la fin de l'expérience (8^{ème} JPI). Des observations similaires par Pusz (2009) et Hubballi *et al.* (2010) sur le taux de croissance des isolats d'*A. alternata* et *A. mali*, respectivement. Les isolats à grosses spores ont eu une croissance plus lente par rapport aux espèces à petites spores, Cependant les souches AT1, AT2, AS1 et AS2 avaient une croissance rapide dans les deux premiers jours (2^{ème} et 4^{ème} JPI) mais celle-ci a régressé en fonction de l'âge des colonies, la croissance lente de ces isolats sur milieu nutritif pourrait être associée à leur capacités saprophytiques limitées qui accentuent ces difficultés. Tong *et al.* (1997) ont rapporté que les colonies d'*A. solani* âgées de 5 jours cultivées sur PSA atteignaient 54 à 70 mm de diamètre, avec une couleur brune à blanchâtre ou grise et que certains isolats ont

secrété des pigments jaunes. Du point de vue survie et prolifération : les variations dans la couleur, la taille, la forme et la texture des spores et des thalles fongiques pourraient être probablement due des adaptations fonctionnelles résultant de l'interaction des tensions au cours du développement de spores (Savile, 1954 ; Chou et Wu, 2002).

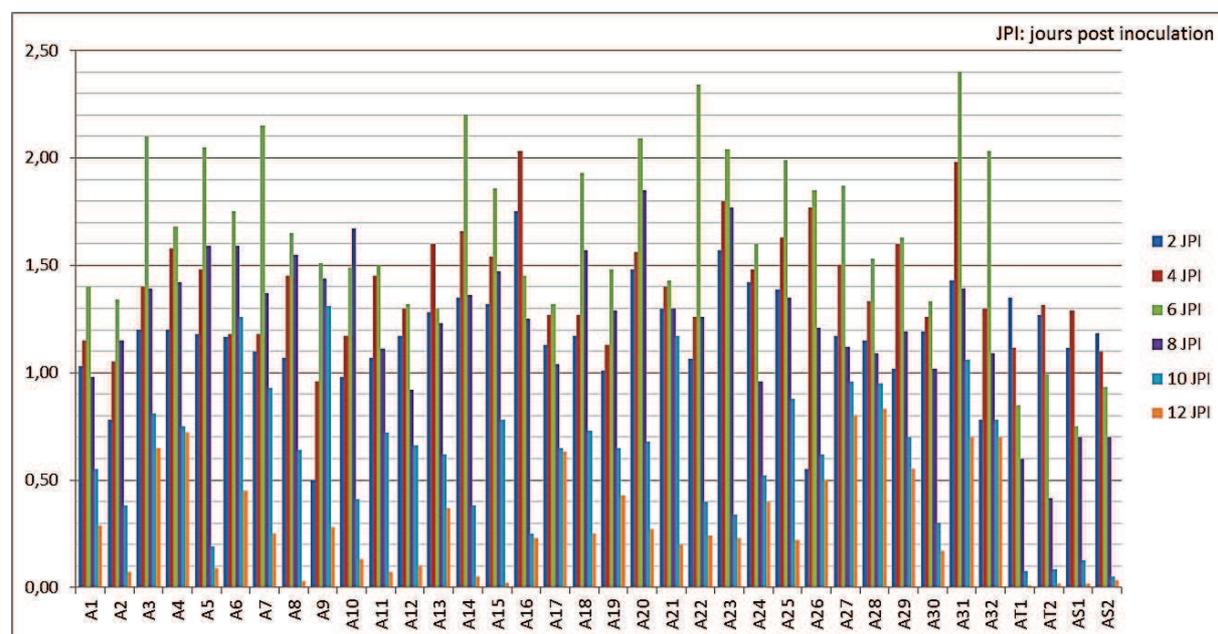


Figure 23: La variabilité de la vitesse de croissance chez les différentes souches testées sur milieu PSA.

2.2. Examen de la morphologie et de la formation des chaînes de conidies

Les 222 souches d'*Alternaria* isolées à partir des *Solanacées* dans le nord-ouest Algérien sont caractérisées selon leur mode de sporulation ainsi que la taille des conidies sur milieu PCA après 5 à 7 jours d'incubation. Les isolats à petites spores sont divisés en trois groupes qui correspondent aux modes de sporulation de la section *alternata* du type 3, 4 et 5 définis par Simmons et Roberts (1993) et ceux de la section *porri* incluant les isolats à grosses spores (Tableau 18).

La figure (25) montre les caractéristiques morphologiques des conidies et la sporulation des souches représentatives de chaque groupe de la section *alternata* qui représente 130 isolats. Dans le type 4 de sporulation (figure 25.A), les conidies se présentent comme des bouquets touffus en chaînes ramifiés. La forme des conidies varie d'obpyriform (forme de massue) à ovales ou obclavée, de couleur brune jaunâtre à brune foncé, avec 1-8 transepta et 0-3 longisepta (ou oblique). La taille de la spore varie entre $6,5$ à $59,8 \times 4,2$ à $16,5 \mu\text{m}$ (Tableau 18). Ce groupe typique d'*A. alternata* représente 17,02 % des isolats de la collection.

Tableau 18: Variabilité dans le cloisonnement et la taille des conidies de 36 isolats d'*Alternaria* sp.

Isolat	Nombre de Transepta		Nombre de longisepta		Longueur (µm)		Largeur (µm)		Groupe/section
	gamme	moy.	gamme	moy.	gamme	moy.	gamme	moy.	
A1	0 - 8	4,17	0 - 2	1,17	9,6- 48	37,68	6,4 - 12,80	8,96	5
A2	0 - 7	4,00	0 - 2	1,08	6,4- 48	35,92	6,4 - 16,00	11,63	4
A3	0 - 7	4,00	0 - 2	1,18	6,4 - 48	33,45	4,8 - 9,60	7,31	5
A4	0 - 7	4,33	0 - 2	1,50	12,8 -51,2	35,92	9,6 - 12,80	9,87	5
A5	0 - 7	4,33	0 - 3	1,42	6,4 - 48	36,65	3,2 - 12,80	9,39	5
A6	0 - 6	3,67	0 - 2	1,08	9,6- 35,2	26,53	8 - 12,80	11,31	5
A7	0 - 7	4,00	0 - 3	1,25	6,4 - 51,2	32,41	6,4 - 14,40	9,49	5
A8	0 - 9	4,83	0 - 3	1,50	9,6 - 59,2	35,10	6,4 - 16,00	10,67	5
A9	0 - 7	4,17	0 - 3	1,42	12,8 -60,8	32,83	9,6 - 14,40	9,97	5
A10	0 - 8	3,67	0 - 2	1,17	6,4 - 41,6	36,44	6,4 - 16,00	10,24	4
A11	0 - 8	4,17	0 - 3	1,50	9,6 - 38,4	40,05	6,4 - 14,40	10,13	4
A12	0 - 8	4,17	0 - 2	0,92	6,4 - 48	36,34	3,2 - 16,00	12,05	4
A13	0 - 6	3,50	0 - 2	0,92	6,4 - 48	32,93	4,8 - 14,40	11,04	4
A14	0 - 8	4,67	0 - 3	1,58	11,2- 59,2	36,28	6,4 - 16,00	11,63	5
A15	0 - 7	4,17	0 - 3	1,42	6,4- 38,4	25,50	6,4 - 14,40	9,33	4
A16	0 - 7	4,17	0 - 3	1,25	9,6 - 48	35,35	6,4 - 16,00	10,77	4
A17	0 - 6	3,17	0 - 3	1,33	6,4 - 48	34,37	4,8 - 16,00	11,31	5
A18	0 - 7	4,17	0 - 2	0,75	9,6 - 48	35,51	6,4 - 12,80	10,46	5
A19	1 - 7	4,00	0 - 3	1,33	9,6 - 44,8	35,20	6,4 - 12,80	9,76	4
A20	0 - 7	4,17	0 - 2	0,85	9,6 - 51,2	34,79	6,4 - 16,00	10,93	5
A21	1 - 9	5,00	0 - 3	1,23	9,6 - 48	38,40	6,4 - 14,40	10,67	4
A22	0 - 8	4,67	0 - 3	1,34	9,6 - 54,4	34,06	6,4 - 12,80	9,33	5
A23	0 - 6	3,83	0 - 4	1,33	9,6 - 38,4	27,77	6,4 - 12,80	8,00	3
A24	0 - 7	4,00	0 - 3	1,45	6,4 - 48	34,79	6,4 - 14,40	11,57	4
A25	0 - 9	4,83	0 - 3	1,13	9,6 - 51,2	36,23	6,4 - 12,80	10,24	5
A26	0 - 8	4,50	0 - 2	0,75	9,6 - 41,6	31,07	6,4 - 12,80	9,28	4
A27	0 - 7	4,00	0 - 3	1,23	9,6 - 51,2	35,41	6,4 - 16,00	10,93	5
A28	0 - 7	4,17	0 - 3	1,13	11,2 -48,4	31,74	6,4 - 12,80	8,85	5
A29	0 - 7	4,67	0 - 2	0,83	9,6 - 48	35,10	6,4 - 11,20	8,37	5
A30	0 - 7	3,67	0 - 3	1,25	6,4 - 44,8	28,90	6,4 - 16,00	10,19	4
A31	1 - 8	3,83	0 - 2	0,67	6,4 - 54,4	38,71	6,4 - 11,20	8,53	4
A32	0 - 6	3,17	0 - 2	1,25	12,8 - 48	29,32	6,4 - 9,60	8,05	4
AT1	1 - 19	16,38	0 - 3	0,85	160 -432	272	12,8 - 38,4	20,8	porri
AT2	1 - 17	15,80	1 - 6	3,42	140,8 -355,2	258,20	12,8 - 25,6	18,13	porri
AS1	1 - 16	11,42	0 - 5	1,33	83,2 -166,4	135,61	12,8 - 30,4	21,79	porri
AS2	1 - 15	12,19	1 - 6	3,23	102,4-195,2	153,44	16 - 38,4	25,6	porri

Le type 5 de sporulation (figure 25.B) correspond à des chaînes modérément longues à longues de plus de 9 conidies, la ramification des chaînes en général est rare (de 1 à 2

conidies) ou manquante. Les conidies produites sont de forme obclavée ou ellipsoïdale, de couleur brune à brune dorée, certaines conidies ont des parois verruqueuse. Les conidies matures sont observées ont 4 à 9 transepta et 0 à 4 longi-septa (ou obliques), leur taille varie de $9,8$ à $60,20 \times 8,6$ à $15,5 \mu\text{m}$. Le groupe typique d'*A. tenuissima* représente 39,14 % des espèces isolées. Le modèle de sporulation type 3 (figure 25.C) se présente en chaînes de conidies de 2 à 6 unités de long qui produisent généralement des branches (1 à 5 conidies) ayant un long conidiophore primaire définit avec de branches terminales et sub-terminales. Les conidies matures ont 1 à 6 cloisons transversales et 0 à 4 cloisons longitudinales ou obliques, elles sont ovales à ellipsoïdales et mesurent entre $9,6$ à $38,4 \times 3,2$ à $12,8 \mu\text{m}$. Ce groupe ne représente que 0,85% des isolats. Pour comparer, Xia et Tian Yu (2008) ont rapporté que les conidies de 27 isolats d'*A. alternata* variaient de $16,5$ à $56,5 \times 6,5$ à $14,5 \mu\text{m}$ et la variabilité des tailles de conidies de 53 isolats d'*A. tenuissima* était de $22,5$ à $42 \times 8,5$ à $12,5 \mu\text{m}$.

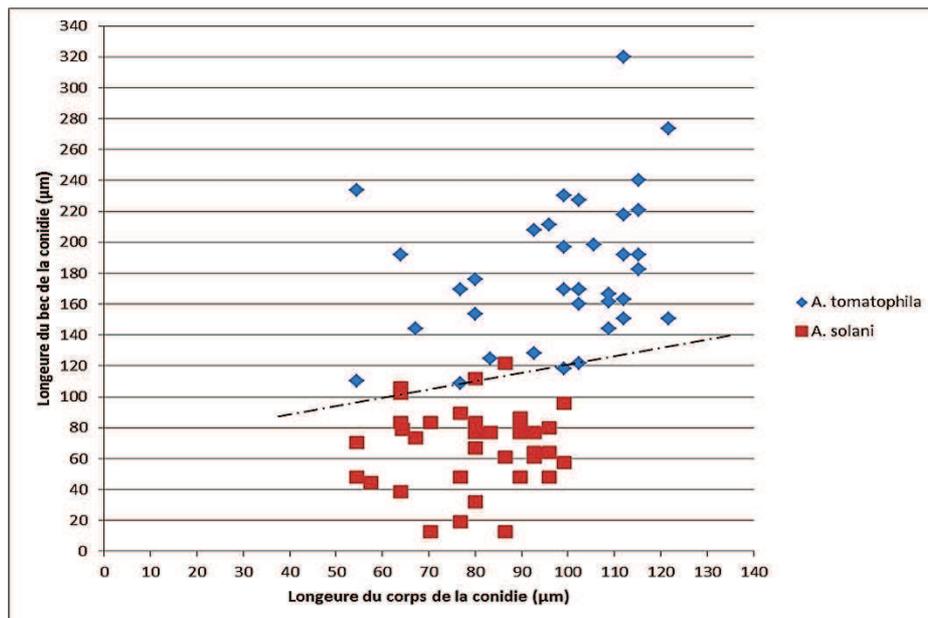


Figure 24: Paramètres morphologiques des spores des isolats de la section *porri* (le morphotype *A. solani* et le morphotype *A. tomatophila*).

Les 92 souches de la section *porri* sont caractérisées par des spores largement ovoïdes, ellipsoïde, sub-cylindrique avec un bec filamenteux simple ou ramifié. Les isolats d'*A. tomatophila* diffèrent d'*A. solani* dans leur mode de sporulation et dans la forme des conidies qui englobent une large gamme de tailles ainsi que dans la morphologie de l'appendice hyalin qui varie d'une à quatre ramifications (figure 26) et mesure entre $41,6$ à $320 \mu\text{m}$. La longueur du corps des conidies mesure entre $54,4$ à $201,6 \mu\text{m}$ et la majorité des spores sont plus ou

moins fines, longues et solitaires, elles mesurent entre $140,8$ à $432 \times 12,8$ à $38,4 \mu\text{m}$ avec 1 à 18 transepta et de 0 à 6 longi-septa. Cette espèce représente 31,91% des isolats de la collection. Les isolats d'*A. solani* produisent des conidies avec un à deux becs filamenteux mesurant entre $12,8$ à $121,6 \mu\text{m}$; la longueur du corps des conidies varie de $54,4$ à $115,2 \mu\text{m}$, les conidies avec deux becs sont rarement formées et ceux à trois becs ne sont pas observées. Les conidies sont moins longues par rapport à ceux d'*A. tomatophila*, elles mesurent entre $83,2$ à $195,2 \times 12,8$ à $38,4 \mu\text{m}$. Des conidiophores secondaires sont parfois formés à l'apex ou latéralement. Les spores sont formées en solo, en paire ou en group de trois à partir du même conidiophore (figure 26 A), le nombre de transepta varie entre 1 à 16 et celui des longi-septa de 0 à 6. Cette espèce représente 7,23% des souches de la collection. La différence entre *A. solani* et *A. tomatophila* est confirmée par les caractéristiques morphologiques des spores (figure 24), ces résultats sont en accord avec ceux d'Orina *et al.* (2012) dans une étude comparative entre les espèces à grosses spores associées à la brûlure foliaire de pommes de terre et de tomate en Russie.

Bien que les caractéristiques morphologiques des conidies et conidiophores fournissent souvent les principaux critères taxonomiques pour l'identification des espèces fongiques le cas des espèces de la section *porri*, ces caractères peuvent être fortement influencés par des facteurs environnementaux. Ainsi, dans la mesure des dimensions de taille des spores, le nombre de cloisons transversales ou longitudinales, des isolats à petites spores correspond souvent un certain nombre d'espèces de la section *alternata* et est souvent difficile sur la base de ce seul critère. En revanche, les modèles de sporulation en 3D constituent un critère morphologique robuste pour la discrimination des espèces d'*Alternaria* notamment ceux de la section *alternata* décrite par Woudenberg *et al.* (2013) et de la section *porri* décrite par Lawrence *et al.* (2013). Le cas de l'espèce *A. arborescens* identifiée sur la base de la forme tridimensionnelle de l'agencement des spores. Cette forme spécialisée a une spécificité parasitaire vis-à-vis à la tomate qui se distingue des autres pathotypes d'*A. alternata* (Simmons, 2000).

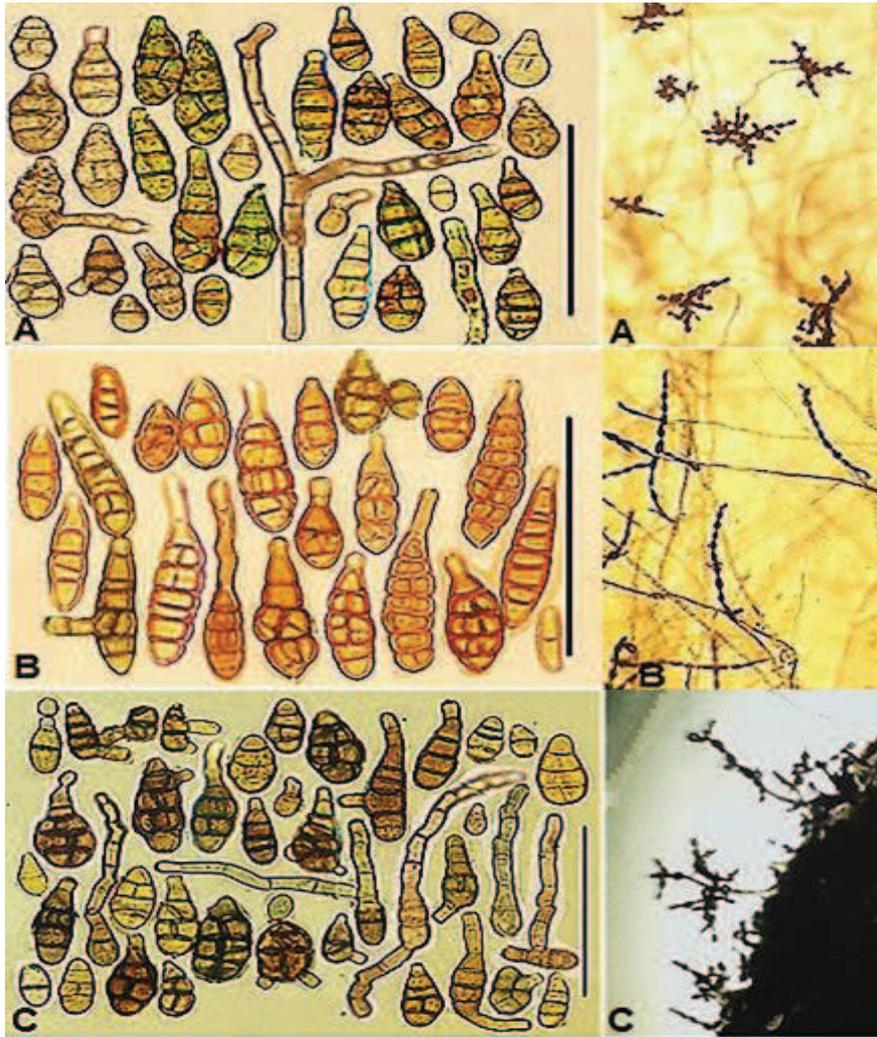


Figure 25: les espèces d'*Alternaria* à petites spores de la section *alternata* ; **A.** conidies et le mode de la sporulation d'*Alternaria alternata* (PCA 7J) isolat A15. **B.** conidies et le mode de la sporulation d'*Alternaria tenuissima* (PCA 7J) isolat A8. **C.** conidies et le mode de la sporulation d'*Alternaria arborescens* (PCA 7J) isolat A23. Bars = 50µm.

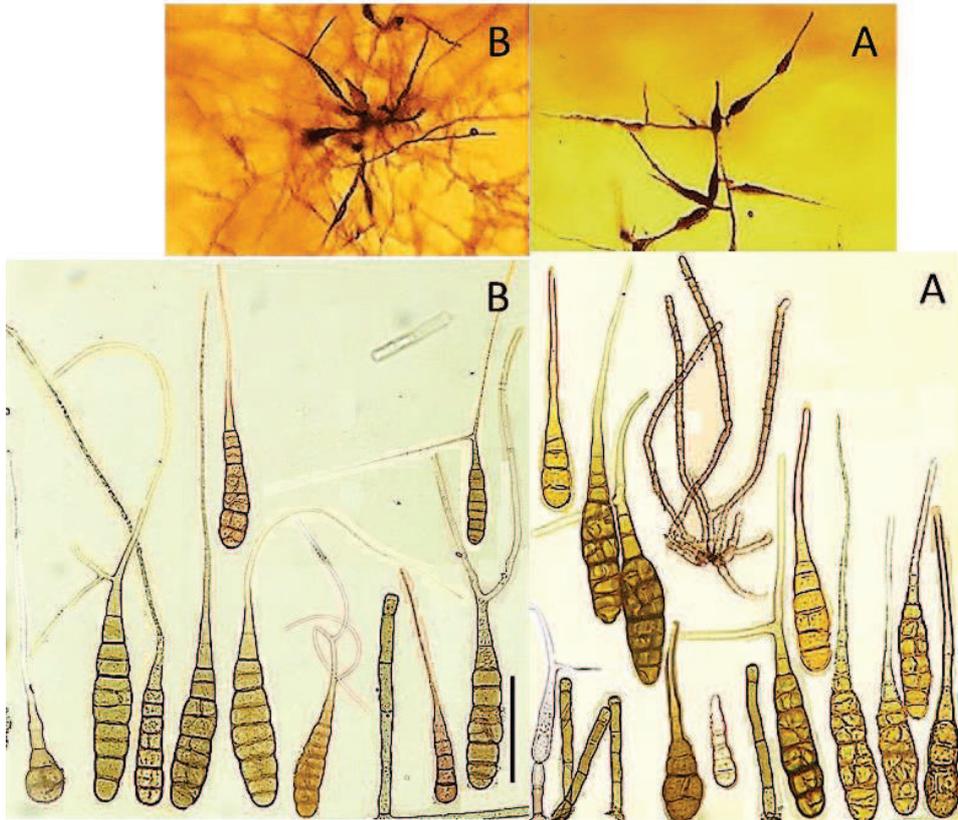


Figure 26: les espèces d'*Alternaria* à grosses spores de la section *porri*; **A.** conidies et le mode de la sporulation d'*Alternaria solani* (PCA 7J) isolat 266. **B.** conidies et le mode de la sporulation d'*Alternaria tomatophila* (PCA 7J) isolat 210. Bars = 50 μ m.

3. Effet des milieux de base

La croissance et la sporulation des trente-six isolats sélectionnés sont évaluées sur différents milieux de culture (figure 28). Une différence dans le taux de croissance est observée chez chaque espèce et chaque isolat (Figure 27). Des taux de croissance relativement élevés sont enregistrés indiquant que les espèces d'*Alternaria* ont la possibilité d'utiliser une large gamme de sources de carbone et d'autres éléments nutritifs. Le milieu Czapek's Dox a soutenu une croissance maximale (moyenne : $7,888 \pm 0,723$ mm/jour) chez la majorité des isolats, mais une sporulation plutôt médiocre ($2,166 \pm 0,982 \cdot 10^5$ spores/mm²) qui est peut-être due à la présence d'ions chlorure. Le taux de croissance sur milieu PCA est presque similaire avec une moyenne de $7,763 \pm 0,425$ mm/jour et un taux de sporulation fongique minimum (moyenne : $0,450 \pm 0,207 \cdot 10^5$ spores/mm²). En revanche, un taux de croissance mycélienne médiocre est obtenu sur milieu à l'extrait de malt (moyenne : $3,902 \pm 1,141$ mm/jour) qui a soutenu par contre une sporulation maximale (moyenne : $16,721 \pm 6,915 \cdot 10^5$ spores/mm²), avec des variations entre les isolats. Un taux de sporulation médiocre (moyenne : $1,334 \pm 0,581 \cdot 10^5$ spores/mm²) et une croissance mycélienne modérée (moyenne : $6,212 \pm 1,072$ mm/jour) sont

observés sur le milieu Mathur. Les milieux riches en éléments nutritifs favorisent la croissance mycélienne avec la perte ultime de la sporulation (UKNCC, 1998 ; Nasraoui, 2006). Les milieux Sabouraud et PSA ont soutenu à la fois une croissance mycélienne modérée (moyenne : $5,501 \pm 1,072$ mm/jour et $5,639 \pm 0,766$ mm/jour, respectivement) et la sporulation est favorable pour les isolats à petites spores ($6,365 \pm 3,618 \cdot 10^5$ spores/mm² et $4,348 \pm 3,064 \cdot 10^5$ spores/mm², respectivement). De même, Benichou (2011) et Benada (2010) ont rapporté que le milieu PSA est favorable à la croissance d'*A. dauci*, tandis que les milieux Czapek et Mathur ont donné un taux de croissance moyen, ils ont aussi noté une croissance faible sur Malt- Agar. En conclusion, l'influence des milieux de cultures a révélé une corrélation négative entre le taux de croissance et la sporulation des isolats. La composition du milieu constitue donc un paramètre physiologique important qui affecte de façon significative la croissance mycélienne et la production de conidies chez les isolats.

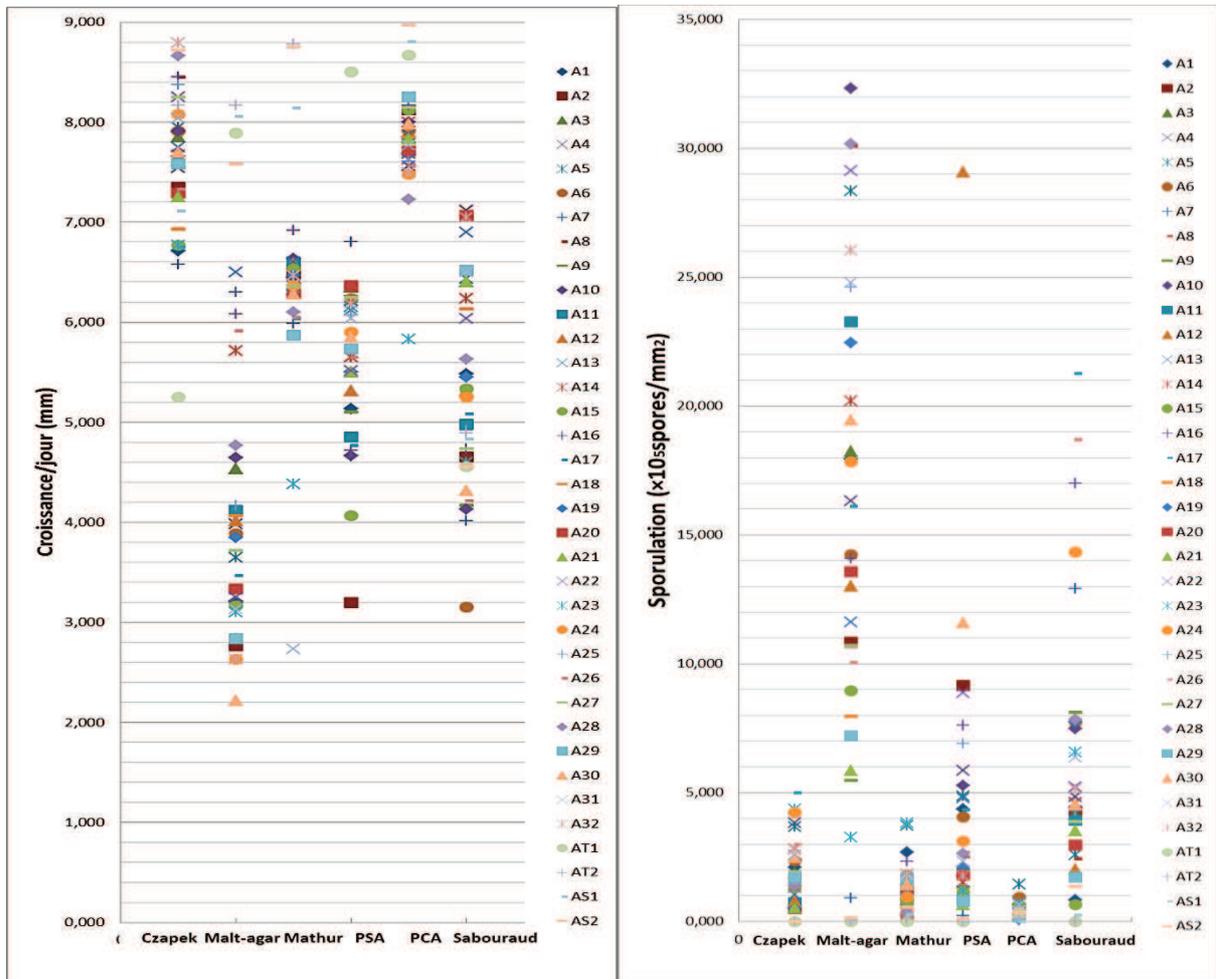


Figure 27: La variabilité du taux de croissance (A) et de sporulation (B) des isolats *Alternaria* sp. sur différents milieux.

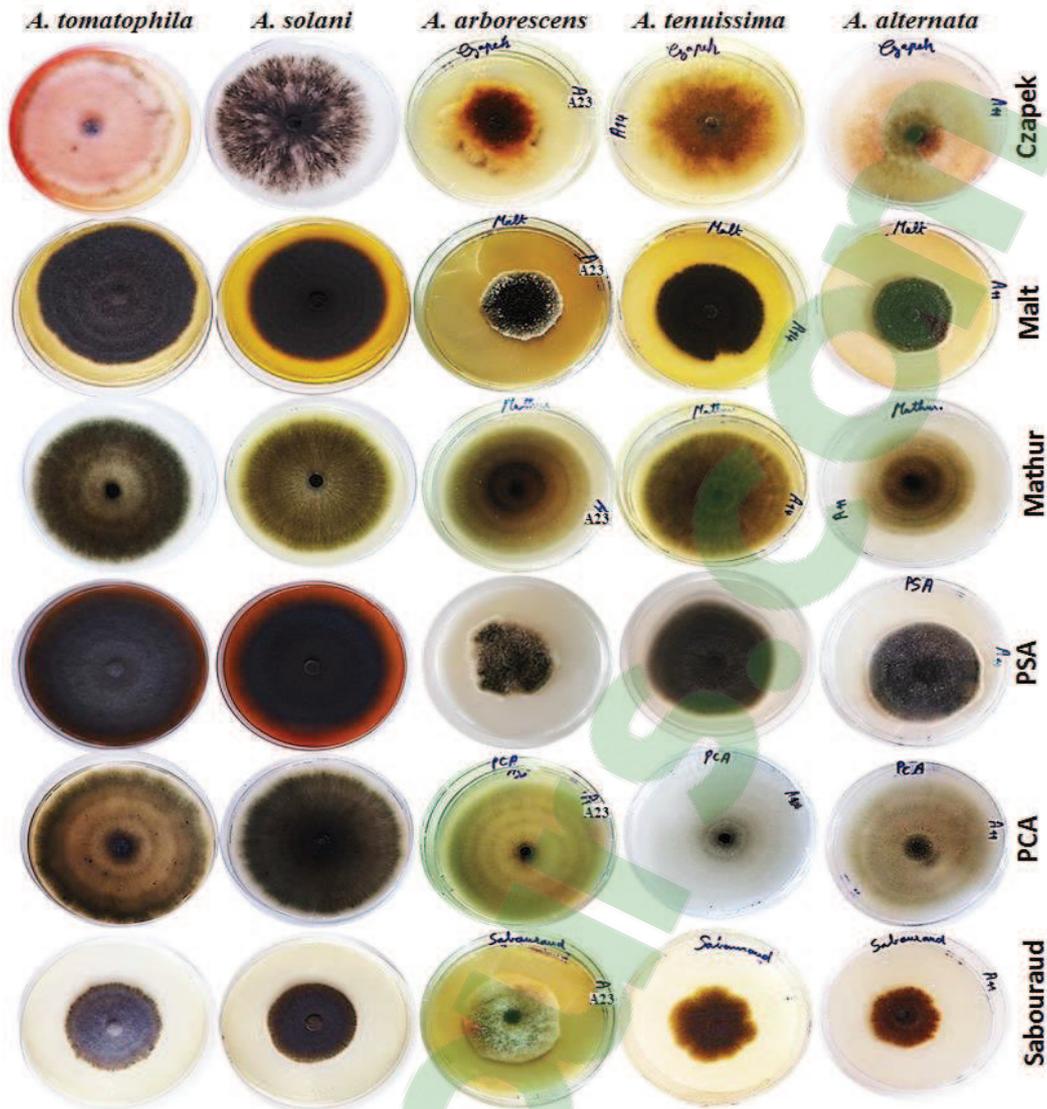


Figure 28: Aspect des colonies des *Alternaria sp.* cultivées sur différents milieux de culture.

4. Effet des sources de carbone et d'azote

Dans cette étude, l'effet de dix sources de carbone et huit sources d'azote (Figure 29) est testé *in vitro* sur milieu de base Czapek modifié. Bien que le type de source de carbone ait peu d'effet sur les taux de croissance enregistrés, la sporulation était beaucoup plus affectée par ce paramètre, et varie de $0,382 \pm 0,244 \cdot 10^5$ spores/mm² sur l'acide citrique et de $2,575 \pm 2,88 \cdot 10^5$ spores/mm² sur lactose. Contrairement à ce qui est enregistré pour les sources de carbone, un effet plus important de la source d'azote sur les paramètres de croissance est observé. La croissance mycélienne des isolats sur différentes sources d'azote s'est révélée plus élevée sur deux sources inorganiques ; le nitrate de sodium ($7,92 \pm 0,721$ mm/jour) et de nitrate de potassium ($7,768 \pm 0,813$ mm/ jour) avec une sporulation modérée ($1,58 \pm 1,298 \cdot 10^5$ spores /mm² et $2,041 \pm 1,558 \cdot 10^5$ spores/mm², respectivement). Ces résultats sont en accord avec

ceux de Goyal (1977) qui a noté que l'azote nitrique est plus efficace que l'azote ammoniacal, il a enregistré une croissance maximale chez *A. alternata* sur le nitrate de potassium, suivi par le nitrate de sodium avec une sporulation optimale. De plus, il a aussi enregistré une croissance maximale sur milieu contenant du maltose suivie du saccharose, l'amidon et du glucose.

Les résultats montrent, une croissance mycélienne minimale enregistrée sur milieu contenant le sulfate d'ammonium ($1,047 \pm 0,374$ mm/jour) sans sporulation. Ces observations sont en accord avec ceux de Saad *et al.* (1970) et Attrassi *et al.* (2007) sur des études menées sur *A. alternata* isolé de feuilles d'haricots de de poires respectivement, ainsi que les observations de Benichou (2011) et Benada *et al.* (2010) sur *A. dauci* pathogène des *Apiaceae*. Tandis que Ramjegathesh *et al.* (2012) ont trouvé que le sulfate d'ammonium était la source d'azote favorable à la croissance d'*A. alternata* isolé à partir de feuilles d'oignon. Alors que de nombreux champignons assimilent bien les sources d'azote inorganiques, comme les nitrates, ils peuvent également utiliser une large gamme d'acides aminés qui induisent différentes réponses fongiques, par exemple il est noté que la majorité des champignons assimilent bien l'asparagine contrairement à la leucine qui donne une faible croissance des champignons (Nasraoui, 2006 ; Brzonkalik *et al.*, 2011). Dans cette étude, les résultats obtenus montrent une croissance et une sporulation médiocre sur les milieux contenant la leucine et l'arginine comme sources d'azote organique tandis que la valine et l'asparagine ont abouti à une croissance modérée ($6,578 \pm 1,173$ et $5,822 \pm 1,161$ mm/jour, respectivement), et une sporulation de $2,543 \pm 2,984$ et $3,156 \pm 3,614 \cdot 10^5$ spores/mm², respectivement. La densité apparente du mycélium de l'ensemble des isolats testés varie aussi en fonction de la source carbonée et azotée (figure 30 et 31), le maltose, l'amidon, l'asparagine, l'arginine et la peptone ont donné un mycélium très dense. Le fructose, le maltose, le saccharose, le KNO₃, le NaNO₃ et la valine ont donné une croissance mycélienne dense contrairement aux autres sources comme la cellulose, le glycérol, le mannitol, le (NH₄)₂SO₄ et la leucine qui ont donné un mycélium peu dense. Sur milieu de base contenant l'acide citrique, le mycélium est très peu dense à ras et peu mélanisé.

Beaucoup de travaux sur les exigences nutritionnelles des espèces du genre *Alternaria* ont été effectués notamment sur différentes sources de carbone et d'azote, comme ceux de Padmanabhan et Narayanaswamy (1977) qui ont rapporté qu'*A. macrospora* assimile mieux le fructose comme source de carbone et donne une bonne croissance sur le nitrate de sodium parmi les diverses sources d'azote inorganiques et organiques testés. Mohapatra *et al.* (1978)

ont enregistré une croissance maximale d'*A. sesami* sur mannitol suivie par le lactose, l'amidon et l'azote ammoniacale. Selon Rane et Patel (1956), le nitrate de potassium, le nitrate de sodium et la peptone sont les meilleures sources d'azote pour la croissance d'*A. macrospora*. Tandis que Pawar et Patel (1957) ont observé une bonne croissance d'*A. ricini* sur le maltose comme source de carbone. Chaturvedi (1966) et Gupta *et al.* (1979) ont indiqué qu'*A. alternata* assimile mieux le fructose, le lactose et le maltose parmi huit monosaccharides testés. En outre, ils ont constaté que, mannitol a soutenu une bonne croissance, tandis que la croissance était faible sur le maltose. Aussi, Bhandari et Singh (1976) ont observé que le fructose est mieux assimilé chez *A. triticina* par rapport au saccharose, glucose, maltose et au lactose, et parmi les sources d'azote, l'asparagine a donné le meilleur taux de croissance. Arunkumara *et al.* (2006) ont testé sept sources de carbone et huit sources d'azote sur la croissance mycélienne d'*A. solani*, ils ont noté une croissance maximale sur le glucose suivi par le saccharose et une croissance minimale dans l'acide lactique. En parallèle, l'asparagine était la mieux assimilée avec un taux de croissance élevé contrairement au sulfate d'ammonium sur lequel un taux de croissance minimum a été enregistré parmi les sources évaluées, ce qui confirme les résultats de notre étude.

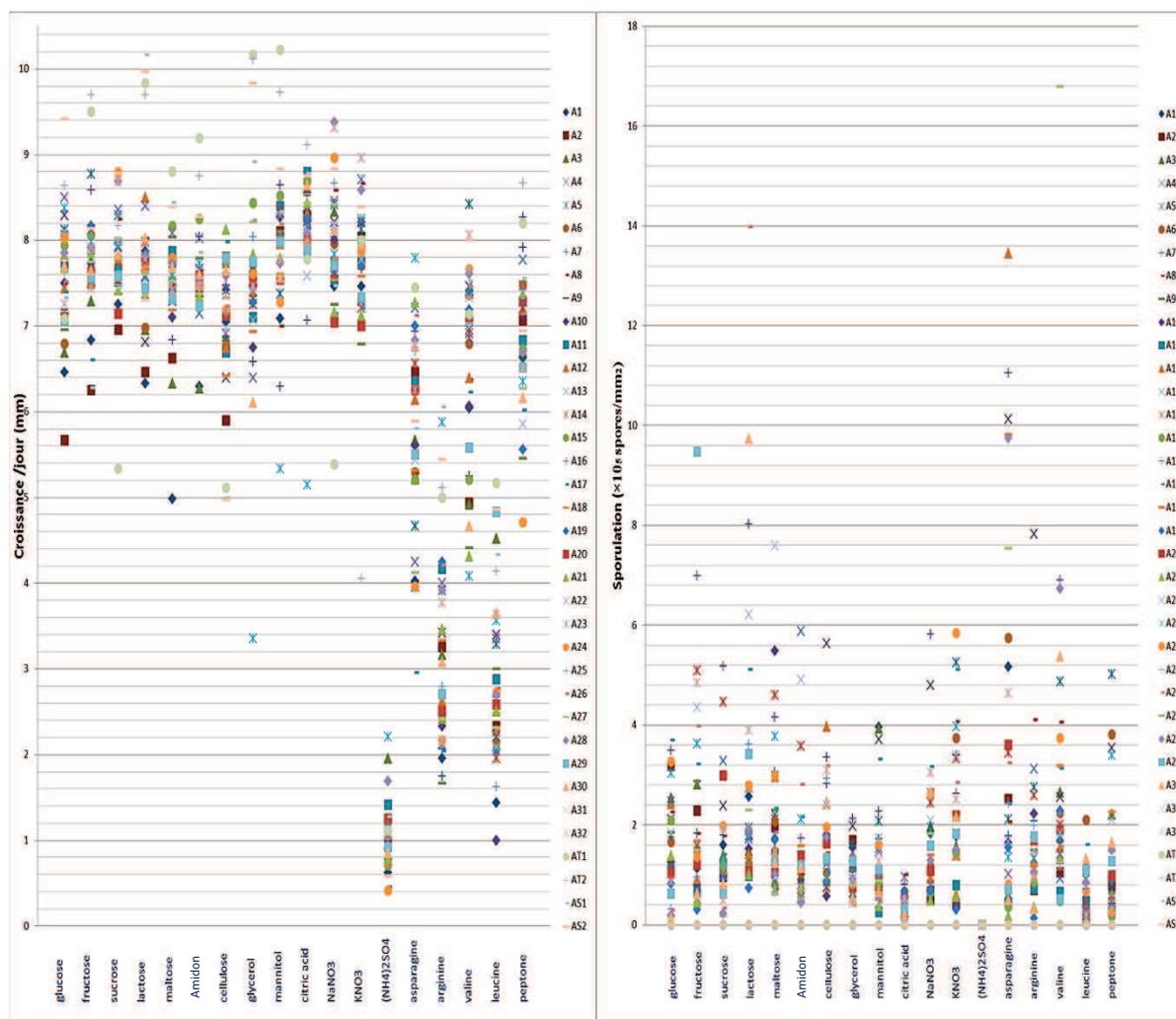


Figure 29: La variabilité du taux de croissance (A) et de sporulation (B) des isolats *Alternaria sp.* sur différentes sources de carbone et d'azote.

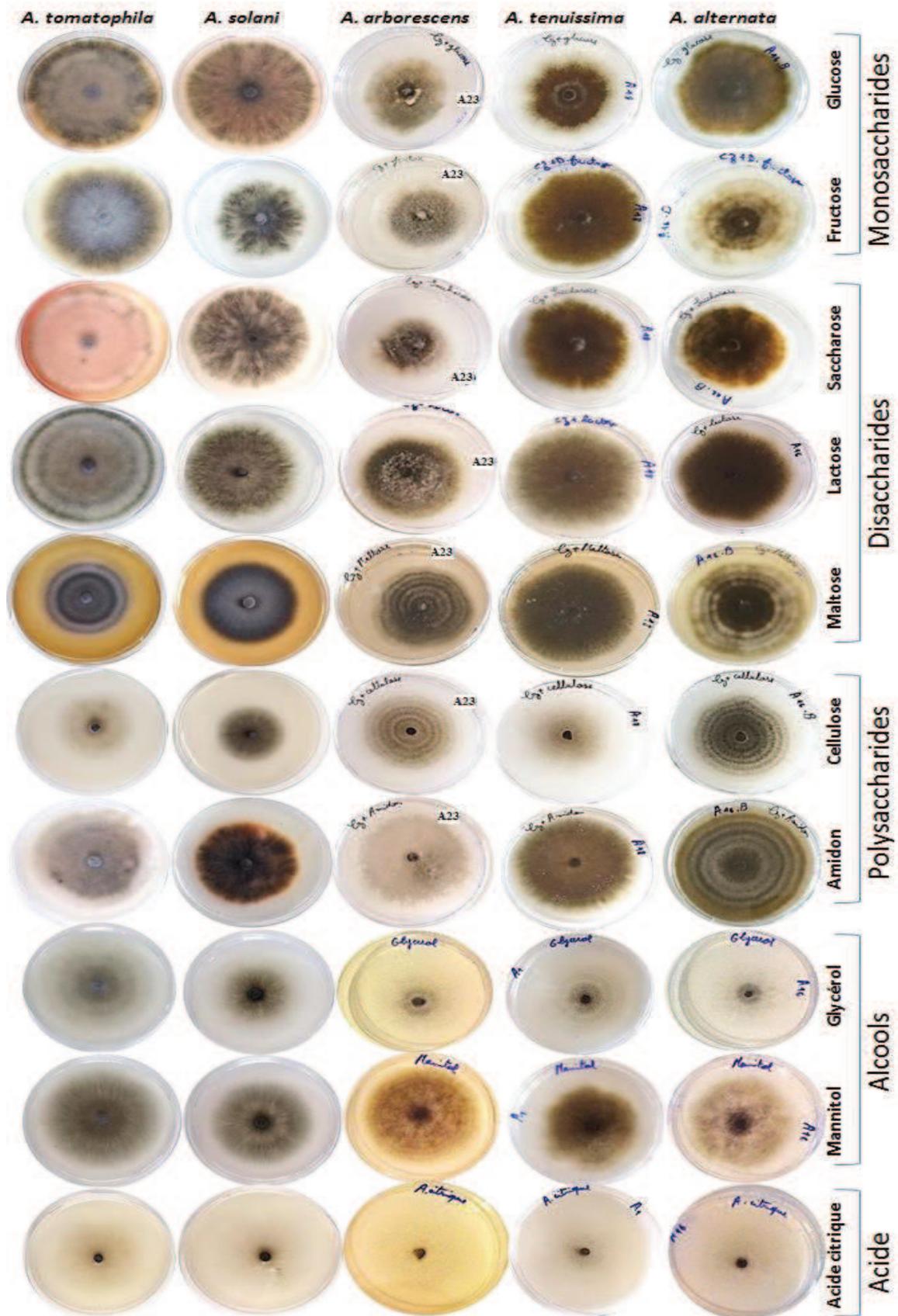


Figure 30: Aspect des colonies des *Alternaria* sp. cultivées sur dix sources de carbone sur milieu Czapek modifié.

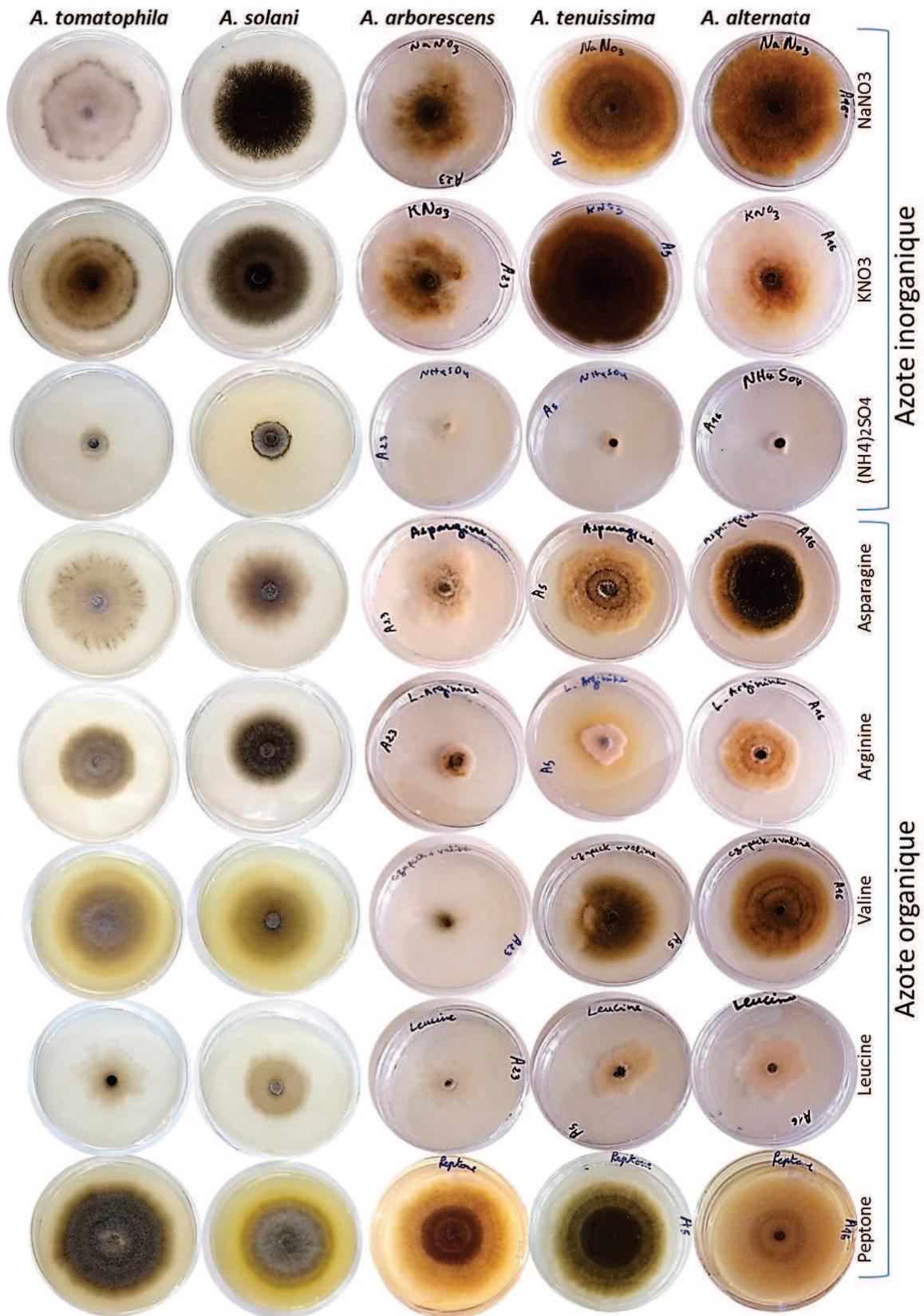


Figure 31: Aspect des colonies des *Alternaria* sp. cultivées sur huit sources d'azote sur milieu Czapek modifié.

5. Effet du pH et de la température

L'impact du pH du milieu sur la croissance mycélienne (Figures 32 et 34), et la sporulation (Figure 34) des trente-six isolats est étudié dans une gamme de pH de 4 à 10. Conformément aux observations précédentes de Madan et Thind (1998) montrant que, généralement, la croissance des champignons est favorable à un pH neutre ou légèrement acide, le pH optimal pour la croissance des isolats est compris entre 6 et 8 (environ 6,6 mm/jour). Les valeurs de pH inférieures à 6 et supérieures à 9 ont conduit à une croissance mycélienne ralentie, un taux de croissance minimum est enregistré à pH 10 ($5,971 \pm 1,183$ mm/jour). Des observations similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs (Johnson, 1923 ; Brancato et Golding, 1953 ; Agnihotri, 1964; Sarbhoy, 1965 ; Khalaf, 2012). Les milieux alcalins ne sont généralement pas reconnus comme favorables à la croissance fongique et la sporulation. En revanche, le pH 4 a donné une moyenne maximale de sporulation ($3,607 \pm 3,37 \cdot 10^5$ spores/mm²) suivi par le pH 8 ($3,482 \pm 3,251 \cdot 10^5$ spores/mm²). Pour comparer, les valeurs de pH optimales à la sporulation variant entre 4,8 et 6,3 ont été rapportés pour différentes espèces d'*Alternaria* (Mathur et Sarboy, 1977 ; Pawar et Patel, 1957 ; Gemwat et Ghosh, 1980). Dans la présente étude, un seul pic est enregistré à pH optimal pour la croissance mycélienne, qui s'avère en corrélation avec le comportement des champignons étudiés par Mehrotra (1964) et Sarbhoy (1965). Cependant, deux pics sont observés en fonction de la moyenne de sporulation des isolats, et ceux comme précédemment rapporté par Mathur *et al.* (1950) chez *Coletotrichum lindemuthianum*.

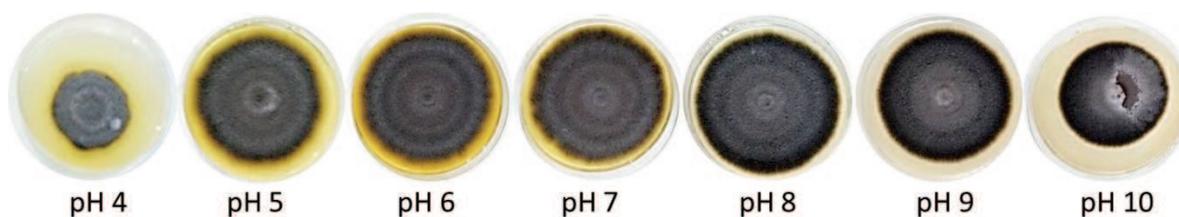


Figure 32: Effet des différents pH sur la croissance mycélienne d'*Alternaria sp.* après huit jours d'incubation.

La température est souvent considérée comme le facteur environnemental physique le plus important pour réguler la croissance et la reproduction des champignons. La majorité des isolats se sont bien développés à une température de 30°C ($7,561 \pm 0,692$ mm/jour), suivie par 25°C ($6,999 \pm 0,835$ mm/jour). La croissance la plus faible est observée à 35°C ($1,227 \pm 0,738$ mm/jour). Dans cette étude, il est clair que les températures allant de 25 à 30°C sont optimales pour la croissance des espèces de la section *alternata*. Ces résultats sont en accord

avec les publications précédentes (Martin et Fernandez, 2006 ; Garibaldi *et al.*, 2007 ; Pose *et al.*, 2009 ; Hubballi *et al.*, 2010 ; Khalaf, 2012) qui ont rapporté que 27°C est la température optimale pour la croissance d'*A. alternata*. Par ailleurs, la température optimale des espèces de la section *porri* se situe entre 20°C et 25°C. Nos résultats sont en accord avec ceux de Tong *et al.* (1997) qui ont noté que la température optimale de croissance d'*A. solani*, pathogène des tomates, cultivé sur milieu de PSA a été de 23 à 28°C et le pH 8.6 a été jugée optimal. De même, Stammler *et al.* (2014) ont rapporté que des températures basses favorisent le développement d'*A. solani* et une température plus élevés celui d'*A. alternata*. Sur l'ensemble des isolats testés, la température la plus appropriée pour la sporulation est de 20°C ($6,798 \pm 6,46 \cdot 10^5$ spores/mm²) suivi par 30 et 25°C. Une sporulation médiocre est observée à 5°C ($1,228 \pm 1,52 \cdot 10^5$ spores/mm²).

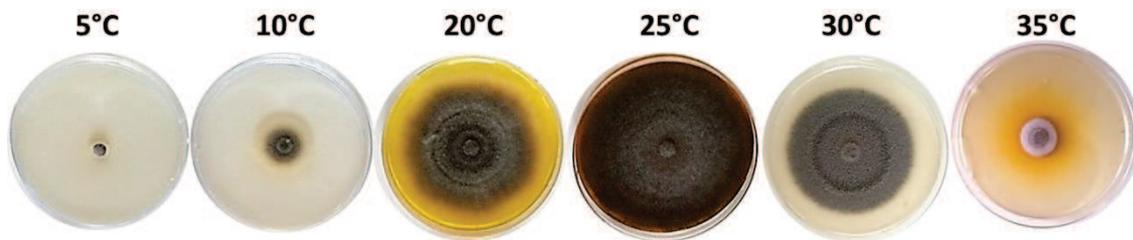


Figure 33: Effet des différentes températures sur la croissance mycélienne d'*Alternaria sp.* après huit jours d'incubation.

Selon plusieurs études, la croissance optimale d'*A. alternata* est proche de 25°C, le seuil limite de croissance est observée à des températures de -5 à 6,5°C et près de 36 °C (Hasija, 1970 ; Domsch *et al.*, 1980 ; Pitt et Hocking, 1997). Par contre, Gravesen *et al.* (1994) ont rapporté que la croissance fongique se limite à des températures de 2°C minimum, de 32°C maximum, et que la température optimale se situe entre 25 et 28°C. L'*aw* minimale pour la croissance à 25°C est de 0,88 (Hocking *et al.*, 1994). La croissance optimale des *Alternaria* à petites spores se situe à un pH de 4 à 5,4, et la gamme de pH pour la croissance est de 2,7 à 8,0 (Hasija, 1970).

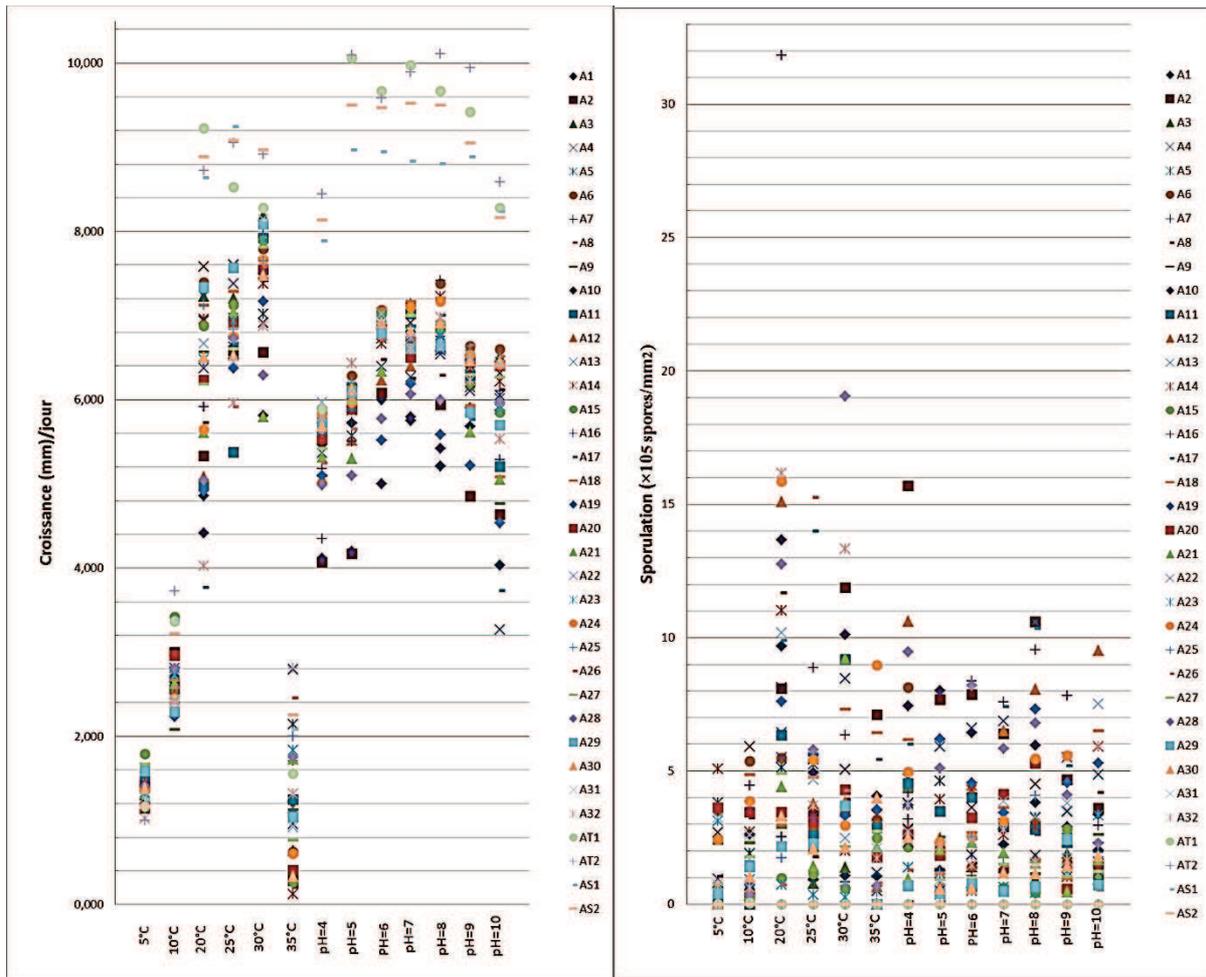


Figure 34: La variabilité du taux de croissance (A) et de sporulation (B) des isolats *Alternaria sp.* sur différentes températures et pH.

6. Analyse globale de la variabilité culturelle et physiologique des isolats

Les résultats combinés du taux de croissance à différentes températures, la morphologie des colonies, les critères physico-chimiques s'avèrent utile dans la caractérisation et la différenciation des *Alternaria spp.* lorsque les conditions standardisées sont appliquées sur des isolats utilisés pour une étude comparative (Guiraud, 2003 ; Andersen *et al.*, 2005). Nous avons donc procédé à une analyse globale des données obtenues à partir des 36 isolats sélectionnés. Le dendrogramme représenté dans la figure (35) est composé de 66 descripteurs. Les souches sont classées en deux principaux groupes (I et II). Le groupe I inclue les quatre isolats de la section *porri*. Le groupe II contient les isolats de la section *alternata* dont une souche *A. arborescens* et 14 souches d'*A. alternata* et 17 *A. tenuissima*. Le groupe I est subdivisé en deux sous-groupes ; la souche *A. tomatophila* (AT1) dans le sous-groupe (Ia) et deux souches d'*A. solani* (AS1 et AS2) ainsi qu'une souche d'*A. tomatophila* (AT2) dans le sous-groupe (Ib). De même, le groupe II est divisé en deux sous-groupes (IIa et IIb) et le

groupe IIa subdivisé en deux sous-groupes ; le premier sous-groupe contient à lui seul la souche d'*A. arborescens* (A23) et le deuxième groupe (IIb) est subdivisé en deux sous-groupes incluant les souches ayant un mode de sporulation typique des espèces *A. alternata* et *A. tenuissima* regroupés dans différents clusters. Le sous-groupe IIb inclut deux souches d'*A. alternata* et deux souches d'*A. tenuissima*. Cette étude a montré une discrimination claire et nette entre les espèces de la section *alternata* et ceux de la section *porri* ayant une distance de similarité supérieure à celle observée entre les espèces appartenant à la même section. Plusieurs travaux ont signalé la variabilité culturelle, morphologique et pathogène parmi les isolats d'*Alternaria spp.* (Singh *et al.*, 2003 ; Slavov *et al.*, 2004 ; Tatarwal *et al.*, 2008 ; Sofi *et al.*, 2013). Rotem (1994) a affirmé que la variabilité des caractères cultureux (couleur, la croissance et la sporulation) permet d'identifier presque autant de critères que le nombre d'isolats testés ce qui explique la diversité observée dans les caractères phénotypiques chez les isolats à petites spores, attribuée notamment aux espèces *A. alternata* et *A. tenuissima*, cela pourrait refléter diverses conditions environnementales dans les régions où ces isolats sont collectés. Toutefois, aucun regroupement géographique n'est obtenu, tous les groupes et sous-groupes contiennent des isolats de différentes régions ayant des conditions agro-climatiques presque similaires.

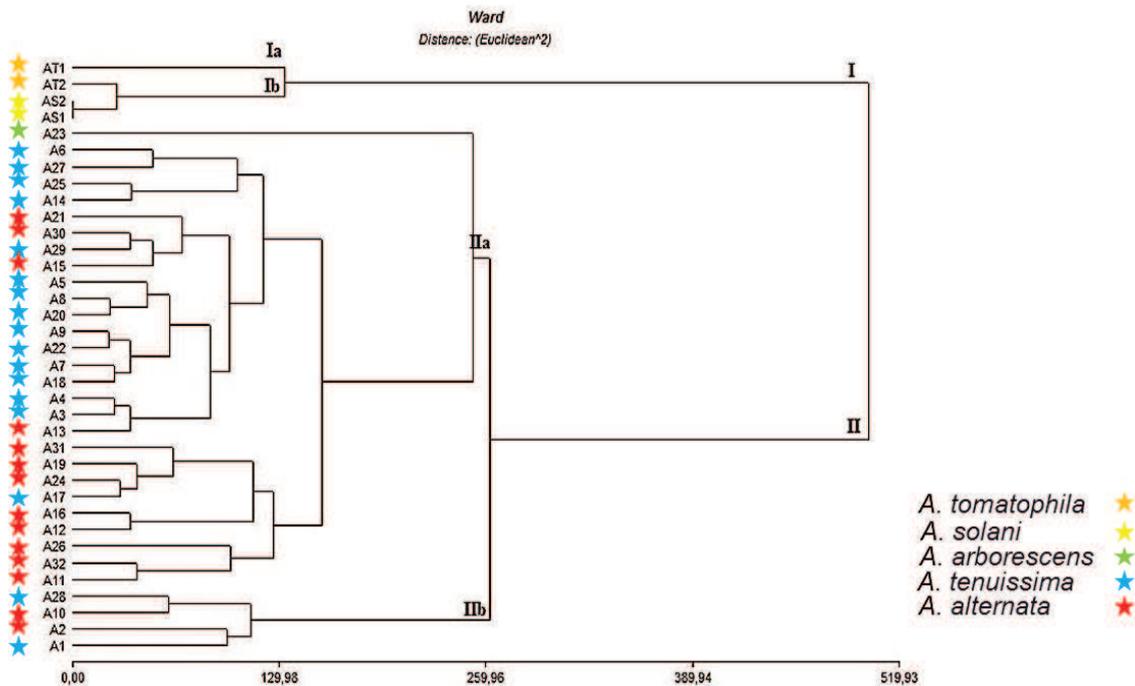


Figure 35: Dendrogramme représentant l'analyse statistique à partir des caractères morphologiques, cultureux et physiologiques de 32 souches à petite spores et 4 souches à grosses spores.

III. Identification moléculaire des souches

À la suite de notre étude, nous avons extrait l'ADN de 166 isolats identifiés au préalable par leurs caractéristiques morphologiques à partir desquelles les régions de l'espaceur interne transcrit (ITS) sont amplifiées par PCR avec amorces universelles ITS1 et ITS4.

1. Séquençage des régions ITS

L'analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques obtenue à partir de 96 souches a divisé l'ensemble des isolats en deux grands groupes ; Le premier groupe est composé des isolats de *Stemphylium* sp. et de *Bipolaris* sp. Les isolats d'*Alternaria* à grosses et petites spores ont formé un groupe appart avec les souches d'*Ulocladium* sp. (Figure 36). Selon les résultats, les souches d'*Alternaria* étudiées sont également divisées en deux grands groupes.

Le premier groupe inclue deux sous-groupes ; les isolats à grosses spores sont classés dans un sous-groupe distinct, comprenant les souches d'*A. solani* et *A. tomatophila*, la structure du génome de ces deux espèces étroitement liées montrant 100 % d'homologie avec les séquences des souches de référence n'a pas permis de les différencier les unes des autres. Exceptionnellement, le deuxième sous-groupe comprend les souches identifiées comme *Ulocladium* sp., celles-ci ayant des séquences identiques à la séquence de référence d'*Alternaria consortialis*, ces espèces possèdent une distance génétique de 0.97% avec les espèces de la section *porri* et de 0.82 % avec les espèces de la section *alternata*.

Le second groupe comprend les isolats à petites spores à savoir *A. alternata*, *A. tenuissima* et *A. arborescens* qui ne diffèrent pas dans la structure de leur génome et, par conséquent, ont montré une homologie de 100% avec les séquences de référence prises à partir de la Genbank. L'analyse de la séquence d'ADN des souches de la section *alternata* a montré qu'ils possédaient une séquence peu différente de la section *porri*, correspondant à une valeur de distance génétique de 0,77 % comme illustré sur la figure 36.

Les données de séquences de nucléotidiques ITS des isolats de *Stemphylium* sp. (230) et *Stemphylium solani* (231 et 260) montrent que les deux espèces possèdent des données de séquence presque identiques avec une distance génétique de 0.66% avec lesquels la souche *Bipolaris* sp. (291) est classée, ce qui implique que la région ADN de cette espèce est proche de celle du genre *Stemphylium*.

Cette étude nous a permis dans un premier temps de confirmer l'identification des groupes d'espèces à petites et grosses spores et ainsi que celle des champignons appartenant aux autres

genres. L'arbre phylogénétique construit sur la base de la région ITS est très résolu et compatible avec la taxonomie morphologique numérique (Wang *et al.*, 2001) et d'une classification traditionnelle, à l'exception de l'ambiguïté d'*Ulocladium sp.* dont les spores sont ovoïdes dépourvues de bec (Simmons, 1967) avec le groupe des espèces *Alternaria* et dont les séquences sont identiques à la séquence de référence d'*A. consortialis*. Ce résultat confirme la suggestion de Pryor et Gilbertson (2000) à placer *U. botrytis*, *U. atrum*, et *U. chartarum* dans *Alternaria*. Récemment *Ulocladium* a été reconnu comme appartenant au genre *Alternaria* à la section *Ulocladioides* par Woudenberg *et al.* (2013). Dans cette étude, les espèces *Alternaria* sont divisées en deux grands groupes et confirment d'une part le dendrogramme obtenu dans l'étude précédente ainsi que l'analyse des ITS par Chou et Wu (2002) et les conclusions tirées de profils de RFLP ADNr par Kusaba & Tsuge (1994), de l'analyse par RAPD-PCR de Cooke *et al.* (1998) et Weir *et al.* (1998).

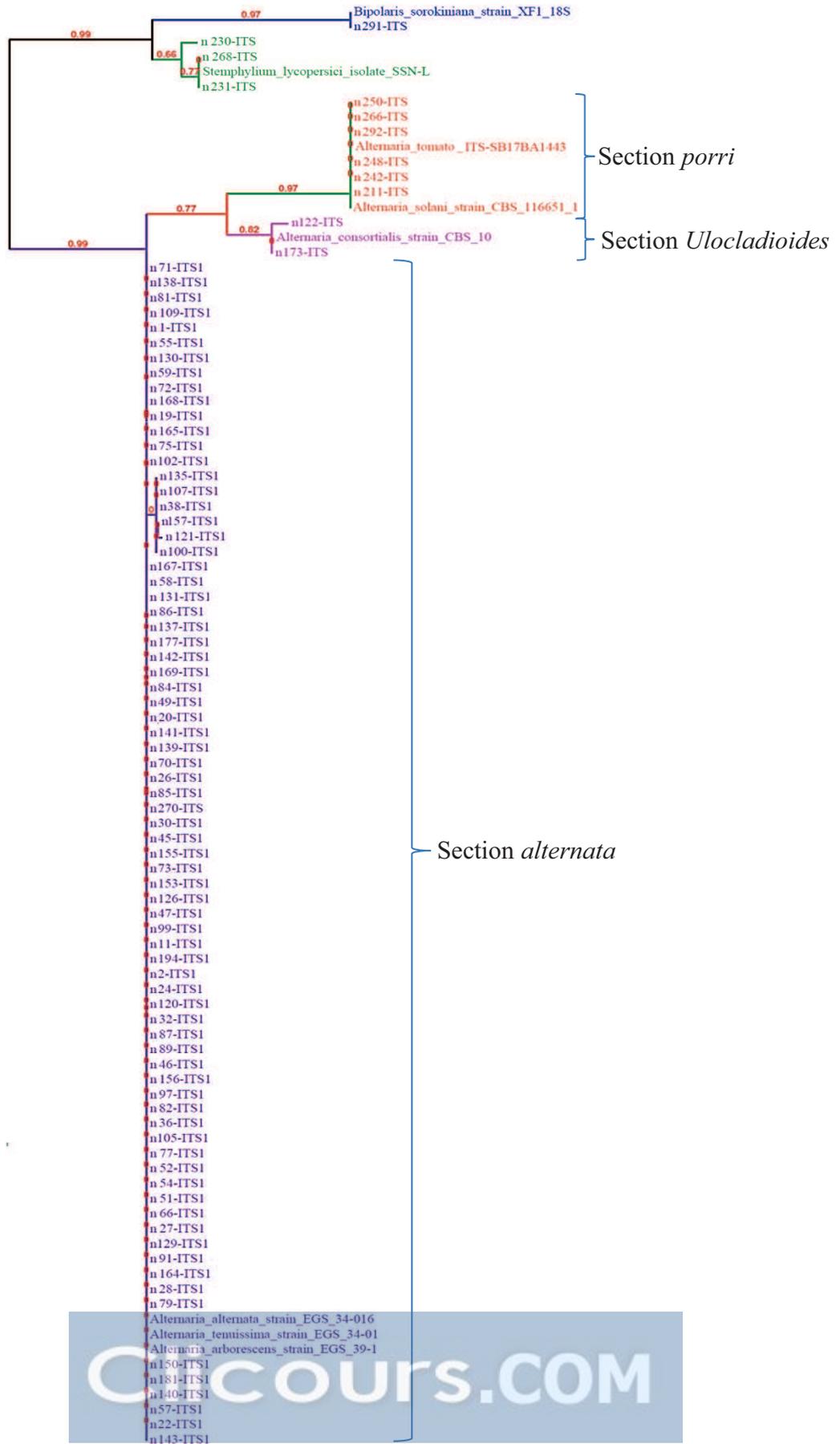


Figure 36: Dendrogramme représentant l'analyse phylogénétique des *Alternaria sp.* comparés aux séquences référencées et genres apparentés à partir des données de séquences ITS des régions combinées des gènes ribosomiques.

2. Séquençage des régions codant pour les facteurs d'élongation

La différenciation d'*A. tomatophila* et *A. solani* n'étant pas possible de façon ambiguë en utilisant la région ITS comme séquence cible nous a conduit à effectuer une autre analyse afin de différencier ces deux espèces étroitement liées, et ce en utilisant le gène codant pour les facteurs d'élongation (EF-1 α). Les séquences nucléotidiques établies à partir des espèces d'*Alternaria* à grosses spores sont alignées par le logiciel Clustal W avec les séquences référencées dans les banques de données moléculaires, qui a permis de définir les variations entre ces espèces. La séquence d'*A. tomatophila* diffère de celle d'*A. solani* par une seule substitution de la thymidine avec la cytosine qui est assez suffisante pour une discrimination entre et les trois souches représentant des séquences identiques à celles des souches de références (Figure 37). Des résultats similaires ont été obtenus par Boedo *et al.* (2012) par l'alignement des séquences du gène (EF-1 α) d'*A. dauci* avec les séquences référencées d'*A. tomatophila* et *A. solani*.

```

A.grandis CBS109158      60      100
A.solani CBS110.41      TCCACCTGGTGCCTCCTCGTTGCGCGCAGCCAAACTCTGGCTTATCGCGA
A.solani MJB10245      TCCACCTGGTGCCTCCTCGTTGCGCGCAGCCAAACTCTGGCTTATCGCGA
Isolate 250            TCCACCTGGTGCCTCCTCGTTGCGCGCAGCCAAACTCTGGCTTATCGCGA
A.tomatophila BA152     TCCACCTGGTGCCTCCTCGTTGCGCGCAGCCAAACTCTGGCTTATCGCGA
A.tomatophila BA144     TCCACCTGGTGCCTCCTCGTTGCGCGCAGCCAAACTCTGGCTTATCGCGA
Isolate 211            TCCACCTGGTGCCTCCTCGTTGCGCGCAGCCAAACTCTGGCTTATCGCGA
Isolate 242            TCCACCTGGTGCCTCCTCGTTGCGCGCAGCCAAACTCTGGCTTATCGCGA
*****|*****

```

Figure 37: Alignements des séquences du gène de facteur d'élongation (EF-1 α) d'*A. solani* (242 et 250) et *A. tomatophila* (211) et polymorphisme entre les deux espèces est marqué dans la case. Séquences des souches de références *A. tomatophila*, *A. grandis* et *A. solani*.

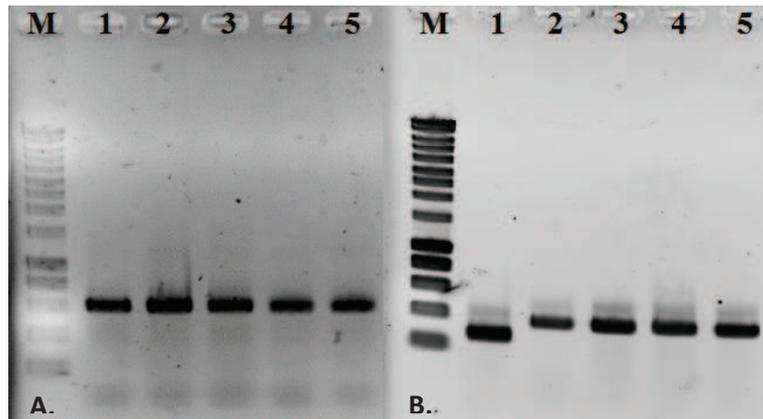


Figure 38: Amplification des ADN extraits à partir des souches *Alternaria* sp. avant séquençage. Piste 1 : témoin CBS102605 (*A. arborescens*) ; Piste 2: souche 250 (*A. solani*); piste 3 : souche 211; piste 4: souche 242 ; piste 5: souche 292. **A.** Amplification avec les amorces universelles ITS1/4; **B.** Amplification avec les amorces facteur d'élongation (EF1-728F /986R).

3. Utilisation des amorces spécifiques

Afin de compléter notre identification sur l'ensemble des 96 isolats restants, nous avons utilisé les amorces spécifiques à chaque espèce et groupe d'espèces représentées dans le tableau 10. La qualité des ADN extraits à partir de ces isolats est d'abord vérifiée par les amorces ITS1/4 (figure 38 A). Les signaux obtenus avec les amorces (OAtF4/ OAtR2) dont la longueur est égale à 438pb, nous ont permis de confirmer l'identification de 74 souches d'*A. tomatophila*, un signal de 164pb est révélé pour neuf souches d'*A. solani* amplifiées avec le couple d'amorces OAsF7/ OAsR6 (figure 39). Il semble que la majorité des souches à grosses spores étudiées, isolées à partir de plants de tomates, représentent plutôt *A. tomatophila* qu'*A. solani* (il est également confirmé par les résultats des diagnostics morphologiques), bien que cette hypothèse contredit l'opinion de Simmons (2007), qui a noté l'absence d'*A. solani* sur les plants de tomates.

Treize souches sont identifiées par le couple d'amorces AAF2/R3 spécifique aux espèces du groupe *alternata* (isolats à petites spores) avec un signal de 341pb semblable à la souche de référence 5983. Parmi ces souches un amplicon d'environ 200pb est obtenu par deux isolats appartenant à l'espèce *A. arborescens* identique à celui la souche de référence CBS102605 amplifié par les amorces DeHF/E8T7 (Figure 40). Les gènes qui codent pour la production de toxines ont à plusieurs reprises servis de cibles potentielles pour la détection de certains pathogènes. Ainsi en ce qui concerne les champignons du genre *Alternaria*, l'identification

par PCR d'*A. alternata* pathotype *arborescens* a été possible avec des amorces spécifiques définies à partir du gène ALT1 qui code pour la production d'une toxine HST, la toxine AAL. Ce test a permis de différencier ce pathogène d'autres pathotypes d'*A. alternata* (Egusa *et al.*, 2009).

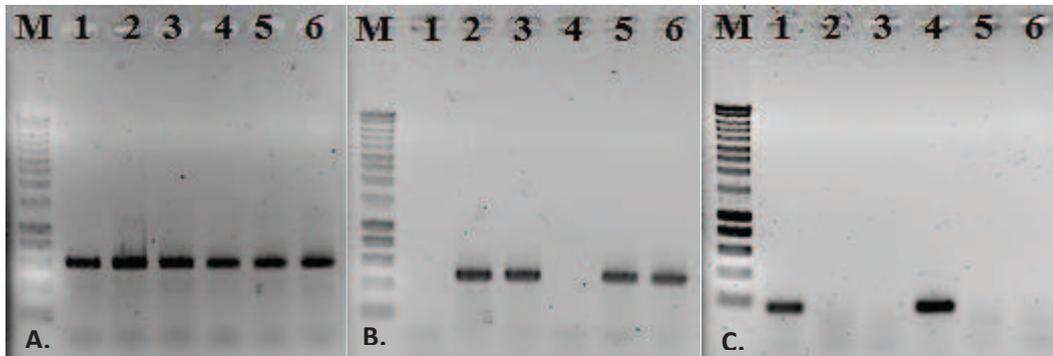


Figure 39: Profils des gels des produits PCR des espèces d'*Alternaria* à grosses spores. **A.** Amplification avec les amorces universelles ITS1/ ITS4, **B.** Amplification avec les amorces spécifiques à *A. tomatophila* (OAtF4/ OAtR2) et **C.** Amplification avec les amorces spécifiques à *A. solani* (OAsF7/ OAsR6) ; piste 1 : souche 266, piste 2 : souche 261, piste 3 : souche 264, piste 4 : souche 250, piste 5 : souche 260 et piste 6 : souche 262. M= Marqueur de taille.

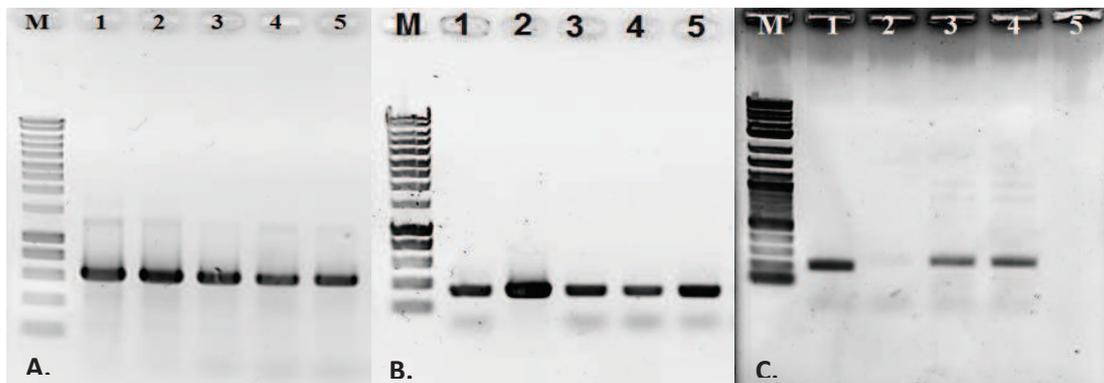


Figure 40: Identification des *Alternaria* à petites spores. Piste 1 : témoin CBS102605 (*A. arborescens*) ; Piste 2: témoin souche 5983 (*A. alternata*); piste 3 : souche 65; piste 4: souche 282 ; piste 5: souche 164. **A.** Amplification avec les amorces universelles ITS1/4; **B.** Amplification avec les amorces spécifiques du groupe d'espèces *A. alternata* (AAF2/R3); **C.** Amplification avec les amorces spécifiques à *A. arborescens* (DeHF/E8T7). M= marqueur de taille (A et B=0.2-10kpb ; C=0.08-10Kpb).

IV. Test du pouvoir pathogène

1. Test sur feuilles détachées

Dans les champs, les espèces de la section *A. alternata* sont présentes en concentrations élevées, c'est pourquoi elles sont souvent trouvées dans les lésions et jugées comme étant la cause de la maladie, ce qui nous a laissé supposer que ces lésions sont dues à des dommages physiologiques. Pour cela nous avons appliqué les postulats de Koch, différents inoculations sont effectuées sur folioles de tomate détachées, saines et blessées, var. Saint Pierre.

Après huit jours d'incubation à 25°C, des pourcentages élevés de nécroses sont enregistrés sur les folioles blessées inoculées avec fragments mycéliens et suspensions de spores par rapport aux folioles sans blessures (Figures 41 et 42). Les résultats montrent que les souches (A2, A12, A13, A16, A19, A26, A30 et A31) d'*A. alternata* et *A. tenuissima* (A1, A4, A6, A8, A9, A17 et A18) ont provoqué des symptômes relativement faibles sur les folioles saines qui semblent parfois presque comme les témoins non traités, ces souches faiblement pathogènes ont eu une capacité à développer des nécroses sur les folioles blessées en raison de l'accès facile aux cellules cibles ce qui confirme leur rôle de parasite de faiblesse. Ces derniers sont donc capables de coloniser seulement les tissus affaiblis tel que les feuilles âgées et les lésions sur fruits mûrs (blackmold) ou les tissus blessés par des coups de soleil, ou encore la fissuration des feuilles par le vent. Tous ces facteurs facilitent l'entrée aux tissus et provoquent des infections opportunistes (Cassol et Sainte-Claire, 1994, Manjunath *et al.*, 2010). En effet, l'entrée de l'agent pathogène dans les tissus peut être un processus actif, les infections opportunistes peuvent également survenir aux blessures car de nombreuses variétés de *Lycopersicon esculentum* sont résistantes à cette forme saprophyte.

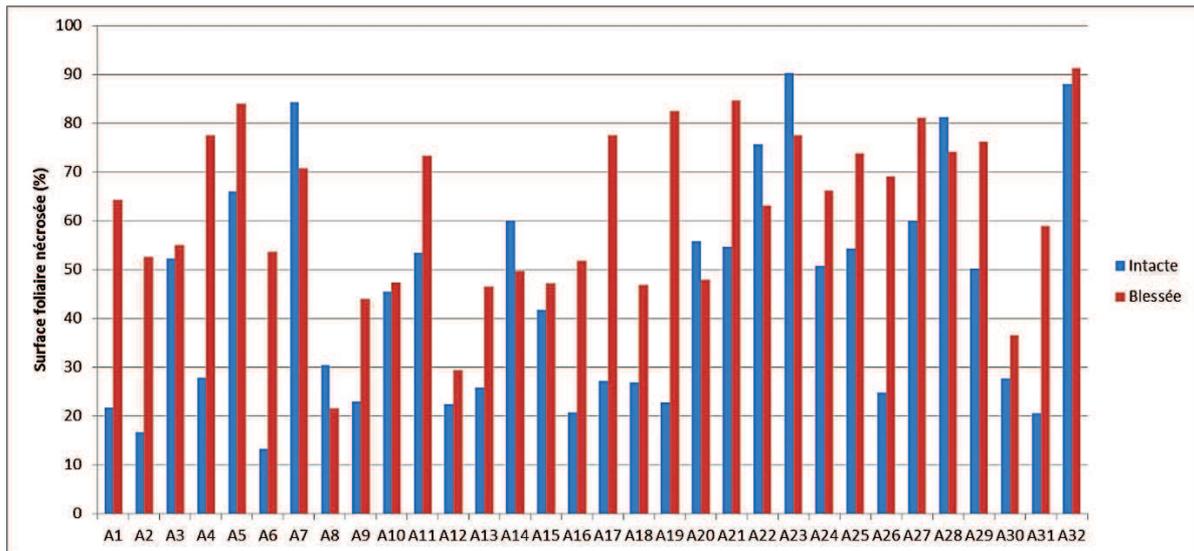


Figure 41 : Effet des inoculations à partir des 32 isolats de la section *alternata* avec fragments mycéliens et effet de la blessure des folioles sur la taille des lésions. Les isolats *A. arborescence*, *A. alternata* et *A. tenuissima* (A23, A32 et A28) provoquent des lésions sur les folioles blessées et non blessées, montrant leur rôle d'agents pathogènes. Les isolats *A. alternata* (A32) et *A. tenuissima* (A28) ne montrent pas de différences significatives par rapport aux folioles blessées.

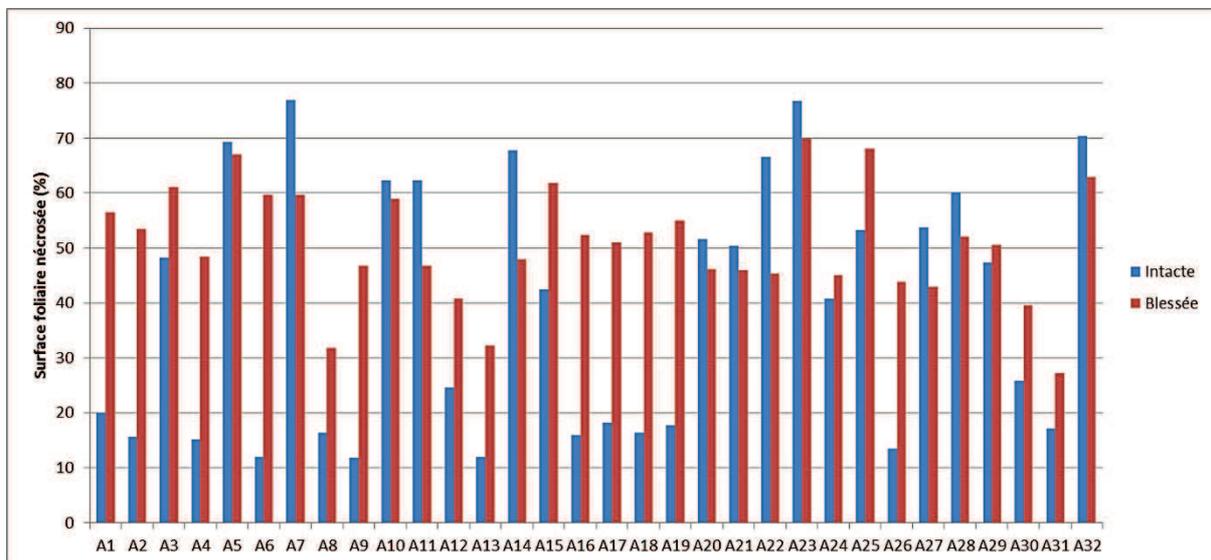


Figure 42. Inoculations à partir des suspensions de spores des 32 isolats de la section *alternata* et effet de la blessure de folioles sur la taille de la lésion. Les souches virulentes provoquent des lésions sur les folioles blessées et non blessées confirmant leur pathogénicité. Les tests de pathogénicité réalisés en chambre de culture par l'inoculation des folioles saines avec des suspensions de conidies et implants mycéliens ont donné des résultats presque

similaires pour la majorité des isolats. La capacité des isolats à produire des lésions à partir du point d'inoculation diffère. Les spores des quinze isolats faiblement pathogènes ont germé sur la surface de folioles sans blessure inoculées avec les suspensions de conidies, mais n'ont pas réussi à provoquer de grandes nécroses. Cependant, les dix-sept isolats ont une capacité relativement forte à produire des infections sur des folioles saines et blessées, incluant sept isolats de l'espèce *A. alternata* (A10, A11, A15 et A21, A24 et A32), neuf isolats d'*A. tenuissima* (A3, A5, A7, A14, A20, A22, A25, A27, A28 et A29) et un isolat d'*A. arborescens* A23. Le groupement non hiérarchique des isolats selon leur virulence les a divisés en deux principaux groupes (Tableau 19). Les isolats du groupe 1 ont une virulence moyenne inférieure à 45%, tandis que ceux du groupe 2 ont des moyennes de virulence supérieure ou égale à 45%. Les lésions sont apparues sur les folioles saines inoculées avec *A. arborescens* (isolat A23) par les deux méthodes (Figures 41 et 42), avec une incidence maximale de la maladie de $83,45 \pm 9,51\%$ suivi par l'isolat A7 ($80,57 \pm 5,18\%$) et l'isolat A32 ($79,16 \pm 12,44\%$) tandis que l'isolat A28 a enregistré $70,69 \pm 14,96\%$. Une incidence minimale de la maladie est enregistrée avec l'isolat A6 ($12,67 \pm 0,93\%$).

D'autre part et en comparaison entre les deux types d'inoculation, il est conclu que le type d'inoculation des folioles de tomate n'affecte pas la capacité du champignon à l'origine des lésions. Cependant, la taille des lésions a légèrement augmenté chez la majorité ses souches à partir des inoculations avec disques mycéliens (Figure 43), qui contiennent moins de spores (environ 10.000 spores/ml), mais de grandes quantités de mycélium par rapport aux folioles inoculées avec les suspensions de spores sur lesquelles les lésions sont plus petites, ce qui souligne l'importance du mycélium et des spores à la fois dans l'induction de la maladie.

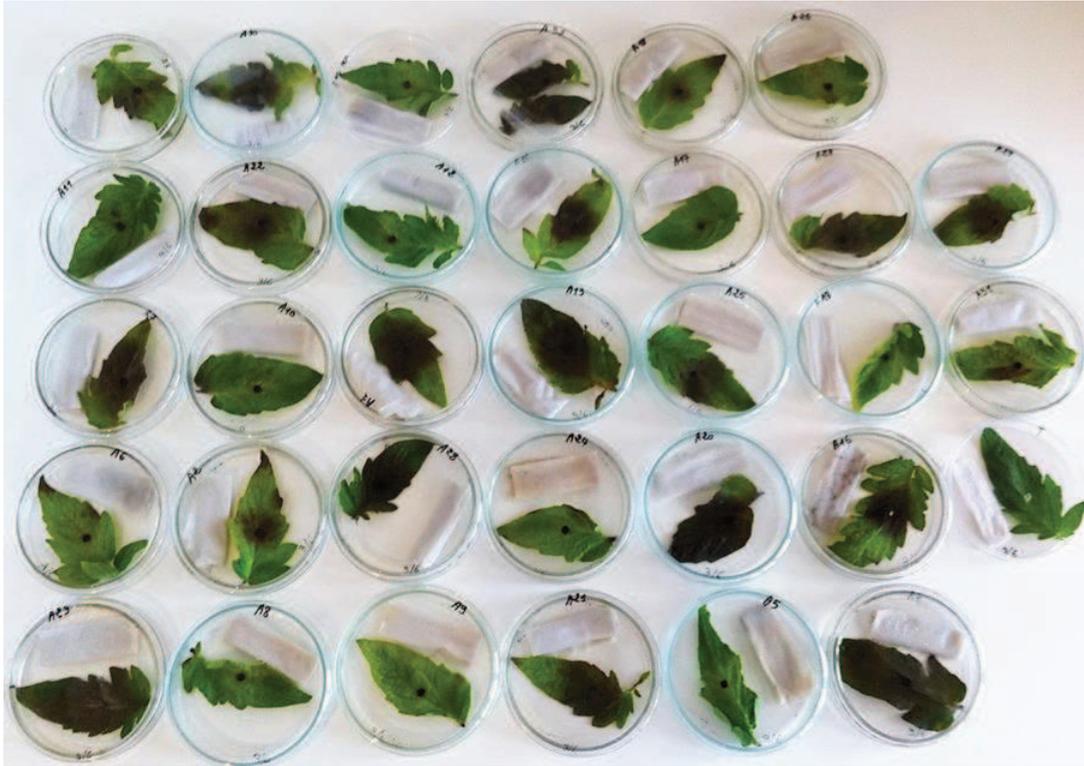


Figure 43: Test de pathogénicité des isolats de la section *alternata* sur folioles de tomates détachées inoculées par fragments mycéliens après huit jours d'incubation à 25°C.

Les tests de pathogénicité ont montré une variation dans la virulence des différents isolats testés. Compte tenu de l'abondance des spores aériennes, les infections actives et opportunistes pourraient entraîner des lésions étant composés de mélanges génétiques. Le pathotype *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, Syn. *A. arborescens* décrit par Simmons (1999), induit des nécroses sur feuilles et des chancres brun foncé sur les tiges souvent mortels suivis par un flétrissement des variétés sensibles de tomates par l'action des AAL-toxines spécifiques à l'hôte (Grogan *et al.*, 1975 ; Weir *et al.*, 1998 ; Mesbah *et al.*, 2000). En outre, de nombreuses espèces d'*A. alternata* et *A. tenuissima* produisent des toxines spécifiques (THS) qui sont des facteurs de virulence essentiels déterminant leur gamme d'hôtes (Nutsugah *et al.*, 1994 ; Kohmoto *et al.*, 1995), les plantes répondent par dépôt de lignine sur la paroi cellulaire des cellules infectées (Von ramma, 1962) afin de limiter la propagation du pathogène.

Tableau 19: Classement non hiérarchique des isolats de la section *alternata* en deux groupes en fonction de leur virulence sur folioles de tomate détachées.

Zones	Isolats	
	Groupe1	Groupe2
AinTemouchent	A1, A12	A3, A14, A28
Mascara	A13, A17, A18, A19	A15, A20, A24
Mostaganem	A4, A6, A8, A9, A16, A30	A7, A10, A11, A22, A23, A25, A27
Oran	A26	A21
Relizane	A31	A32
Sidi Bel Abbes		A29, A5
Tlemcen	A2	

Groupe 1 est le moins virulent (moyennes < 45%) et le groupe 2 est le plus virulent (moyennes \geq 45%).

D'autres études sont nécessaires pour étudier un grand nombre d'isolats des espèces à petites spores de notre collection sur la base de leur pouvoir pathogène afin de vérifier s'ils peuvent également être considérés comme des producteurs potentiels de TSH.

2. Test sur plantules de tomates

2.1 Réaction variétale

Cette étude a fait l'objet d'une publication (annexe 1) qui consiste à évaluer 86 souches de la section *alternata* incluant ; 58 souches d'*A. tenuissima*, 27 souches d'*A. alternata* et une souche d'*A. arborescens*, et ce afin de confirmer si les espèces à petits spores présentent une différence de virulence. Les plantules de tomate âgées de quatre semaines var. Saint-Pierre, tomate cerise et Rio Grande, inoculées avec les suspensions de spores ont présenté des symptômes sur les feuilles avec différents niveaux d'agressivité. Les données sont présentées dans les tableaux (20 et 21) représentent l'incidence de la maladie et l'aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC) qui varient parmi les isolats et les variétés de tomates. Les plantules témoins pulvérisées avec de l'eau distillée stérile n'ont présenté aucun symptôme après 21 jours post inoculation.

Tableau 20: incidence de la maladie en pourcentage et AUDPC des souches *A. alternata* et *A. arborescens* sur les variétés de tomates évaluées sous serre.

S. No	Incidence de la maladie												Moy .21 JPI
	Saint Pierre				Tomate cerise				Rio Grande				
	% moy. 7 JPI	% moy. 14 JPI	% moy. 21 JPI	AUDP C	% moy. 7 JPI	% moy. 14 JPI	% moy. 21 JPI	AUDP C	% moy. 7 JPI	% moy. 14 JPI	% moy. 21 JPI	AUDP C	
8	5	12,5	43	365	3	12	79,1	533	6,5	11,5	49	401	4
32	4,5	10,5	13,5	209	1	8,5	22,5	217	5	11	24	273	3
42	13,5	24	52	605	0,5	1	1,5	40	30	49	70	1025	4
57	25	30,5	75	871	4,5	11,5	26,65	294	8	29	52,5	589	4
65	23	44	49	829	3,5	17,5	85	610	43,5	48,5	63,15	1080	5
69	4	11	12	211	3	9,5	19,15	227	6	12	31,5	331	3
71	2,5	13	52	423	3,33	5	12,5	135	6,5	15	25	319	3
77	2,5	14	46,5	394	3,55	16,55	55	473	4,5	16	49	435	4
79	7,5	14,5	31	356	1	3,5	24,15	170	2	2,5	6,5	78	3
84	3,5	10	19	220	7,5	23	24	410	5,5	23	72	617	3
85	6	13,5	49	417	1	1,66	3,33	50	2,5	17	47	408	3
91	9,5	29	61	657	6,66	16,5	60	496	2	4,5	12	110	4
97	2	2,5	5	70	0,5	2	2,5	52	3,5	6,55	24,5	205	2
100	6	20,5	52	502	1,66	3	5	70	6,55	18,5	86	642	4
105	3,5	15,5	32	343	2,5	4	17,5	146	0,5	3	3,55	50	2
107	5	20	60,55	529	2,5	15	37	349	7,5	31	43	558	4
129	17	61	69	1051	7,05	12,5	24	299	5	18,5	66	515	4
131	4,5	12	30	302	2	4,55	19,5	169	0	0,5	1,5	250	2
135	7,5	23,5	65	604	2,5	8,5	21,66	222	20	21,5	32	492	3
141	8,5	15,5	32	371	8	9	10,5	199	21	32	41,55	666	3
143	8,5	13	18,5	282	7	16	18,75	301	3	18,5	25,5	313	3
156	12,55	25	90	778	5	33	82	754	8	17	46	424	5
161	2	13,55	87	566	0	2,5	9,5	81	2	10	81	465	4
165	5,5	11,5	16,5	232	4,55	17,5	27,5	340	6,55	40	59,5	707	3
167	3	12,55	35	325	2	6	17	172	4,5	16	23	308	3
168	4	6,5	32,55	259	2	9	15	174	6	21	46,55	466	3
194	1	5	15	148	12	16	27,5	384	10	21	59	569	3
229	2,5	16	53,55	502	5,45	13,5	20	314	14	27	30	579	3

^a indice de maladie des moyennes à 21 jours post-inoculation des trois variétés évaluées sur une échelle de 0-5.

Des différences de l'aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC) sont enregistrées sur les variétés de tomates. La moyenne de l'AUDPC pour la variété Saint Pierre est de $413,72 \pm 286,05$. Des différences similaires dans la variété Rio Grande sont trouvées avec AUDPC moyenne de $390,48 \pm 253,24$. Cependant, la tomate cerise s'est révélée résistante avec une moyenne de $227,18 \pm 166,10$. La sensibilité de la variété Saint Pierre à la brûlure foliaire est considérable, nos résultats sont en accord avec ceux de Fontem (1993), qui a également noté que des variétés de tomates comme Saint Pierre, Heinz 1370 et Marmande ont été touchés par de graves symptômes d'alternariose sur les cultures en plein champs. Fontem (2003) a rapporté que Rio Grande est parmi les variétés de tomates les moins sensibles à la brûlure foliaire par rapport à dix autres variétés de tomates, ce qui est en contradiction avec nos résultats.

Tableau 21: incidence de la maladie en pourcentage et AUDPC des souches *A. tenuissima* sur les variétés de tomates évaluées sous serre.

S. No	Incidence de la maladie												Moy. 21 JPI ^a
	Saint Pierre				Tomate cerise				Rio Grande				
	% moy. 7JPI	% moy. 14 JPI	% moy. 21 JPI	AUDPC	% moy. 7 JPI	% moy. 14 JPI	% moy. 21 JPI	AUDPC	% moy. 7 JPI	% moy. 14 JPI	% moy. 21 JPI	AUDPC	
1	15	50	69	954	5	16	36	380	14,5	23	35	479	4
11	8	23,5	52	556	4,5	5	16,66	164	3	6	26	206	3
20	2,5	8,5	22	221	3,5	11	26,66	282	5	16,5	49	456	3
24	5	27	29	460	1,65	3	7,5	81	3,5	8	16	192	2
28	0,5	1,5	4,5	55	2	2	20	141	4	11	20,5	243	2
30	3,5	11,5	21	288	2	3	6,66	93	1,5	2,5	3,5	78	2
36	7,5	10	32	309	4	20	35,5	385	5,5	20,5	34,4	407	3
38	5	15	61	480	4	18,5	53,33	473	8,5	27	55	578	4
41	12,5	44,5	67	842	3,33	6	12,5	135	7,5	14	32	315	2
45	15	22,5	86	711	14,5	28	33	529	27	47	92	1059	5
46	4,5	12	30	300	1	3	38,33	218	3	15	49	410	3
47	4,5	13	22,5	275	1	2	2,95	58	8,5	25	40,5	486	3
49	3	4,5	28,5	223	0,5	1	3,33	48	2	4,55	6,5	95	2
51	4	9,5	14	203	1,5	2	2,9	60	0	1	3	37	2
52	2	9	18	195	1,25	5,5	12,5	130	4,5	7,5	12	162	2
54	6	12	13,5	225	2,5	11	26,6	253	7	13,5	29,05	322	3
55	2	7,5	15	172	1,5	2,5	3,75	69	1,5	3,33	13	118	2
56	7	10	20,5	272	0,5	1	1,5	40	12,5	22,5	34,5	481	2
58	2,5	3	6	89	4,5	17,5	21,65	309	2,5	6	9	129	2
59	1,55	2,45	5	71	4,5	16	41,66	410	1,55	9,55	20	214	2
60	4	9	11,5	164	3,5	15	70	521	4,5	10	35	318	3
70	1,5	2	3	54	2	3,5	5	71	2,5	9,5	24,5	225	2
72	23,5	47	63	955	3,5	6	9,15	133	0	0,5	1	13	3
73	1	2	8,5	73	0,55	1	5,88	56	1	1,5	6	61	2
75	13	27,5	54	498	2,5	6	15	320	4,5	9,5	15	560	3
81	4,5	29,5	38	512	6	13,33	59,5	465	3,5	4,5	12	124	3
82	3,5	8	29	258	1	2	2,95	56	2	3,5	10	92	2
83	1	4,5	23,5	158	0	0,55	1	20	0,55	2	4,55	51	2
86	4	15	38,5	393	2,95	6,5	10	156	8	12,5	32	350	3
87	2,5	4	8	85	2,95	7,5	19,15	163	7	11,5	24	361	2
89	9,5	20	41	486	3	9,5	35	299	6	14,5	33	357	3
98	24,5	50	86	1066	3	12,5	40	336	7,5	26,5	67	110	5
99	2,5	27,55	46	527	3,5	7	12,5	161	30	41	55	608	3
102	3,5	6	13,55	162	1	1,5	4,55	66	8,5	35	66	898	3
104	4	6,5	15	178	2	4,5	10	108	2	17	42	723	3
109	4,5	12,5	46	404	0,5	2,5	3,33	56	1	2,5	9	390	2
120	11	31	54	659	1,66	4,5	10	123	21	30	58	88	4
121	8	12	16	255	2	9,5	21,65	228	9	21	58	726	3
126	2,5	23	47,5	485	1,5	2,5	4	63	1,5	20	27	557	3
130	1,5	3	10	118	1	2,95	5	87	4	8,5	9	347	2
132	0	1	3	35	3	7,5	34,5	265	2,5	10	12	181	2
137	2	3	6	79	0	0	0,5	9	21	37	64	178	3
138	4,5	10,5	19	222	1	2,5	5	66	4,5	12,5	26	859	2
139	7	13	15	248	1,55	3,5	7,55	96	12	17	21	286	2
140	20	30,5	41,25	650	2,5	3,5	5	79	7,5	21	46	358	3
142	7,5	12	16,55	257	1,25	14,55	52,6	408	16,5	25,5	29	489	3
150	9	21	72	580	2,5	12	29,15	251	5	23,55	92	507	5
151	16	52	63	926	7	14,5	55	454	6	28	44	631	4
153	5	11,5	53	480	1,5	4,5	10,88	139	4	6,5	10,5	503	3
155	8	18,5	54,5	522	6	14,5	27,5	321	3	7,5	13	176	3
157	14	32	86,66	852	2	3,5	9,15	101	4	15	27	143	4
164	35,5	63	96	1544	9,5	17	59	600	23	33	69	293	5
174	4,5	16	21,55	305	2,5	6,5	17,99	186	2,5	5	12,5	934	2

D'autre part, Stancheva et Stamova (1991) ont rapporté que les variétés de tomates Triomph et Emona ont montré une résistance des tiges, plus efficace que la résistance de la feuille à l'alternariose en comparaison avec les variétés Man Lucie et Novinka Pridnestrov'ya. Aussi, Foolad et Ntahimpera (2000) ont évalué vingt-neuf génotypes de tomate sur terrain, sous serre et en chambre de culture (cultivars, lignées, et plantes introduites), représentant trois espèces de *Lycopersicon* sélectionnées pour leur résistance à la brûlure foliaire causée par *A. solani*. Leurs résultats démontrent des différences significatives entre les génotypes dans leur réponse à l'infection avec *A. solani*.

En comparaison entre les différentes souches d'*A. alternata* testées (Tableau 20) selon l'indice de maladie (cf. l'échelle présentée dans le chapitre 2), l'incidence maximale de la maladie est enregistrée avec l'isolat 165 avec 90% sur Saint Pierre, 82% sur la tomate cerise, 46% sur Rio Grande et qui figure dans la catégorie '5', suivie par l'isolat 161 qui a enregistré un taux de 87% sur la Saint Pierre, 9,7% sur la tomate cerise et 81 % sur la Rio Grande, qui est classé dans la catégorie '4'. L'isolat 97 a enregistré une l'incidence minimale de 5% sur Saint-Pierre, 2,5% sur la tomate cerise, 24% sur Rio Grande qui est classé dans la catégorie '2'. Cependant, la souche 164 a une incidence maximale de la maladie parmi les isolats de l'espèce *A. tenuissima* avec un taux de 96% sur la Saint-Pierre, 59% sur la tomate cerise et 69% sur la Rio Grande, suivie par la souche 45 qui a enregistré un taux de 86 % sur la Saint-Pierre, 33 % chez la tomate cerise et 92% chez la Rio Grande, les deux souches sont classées dans la catégorie '5'. L'incidence minimale de la maladie est enregistrée avec la souche d'*A. tenuissima* 51 avec une taux de 14% sur la Saint Pierre, de 2,9% sur la tomate cerise et 3% sur la Rio Grande. Alors que le seul isolat *A. arborescens* (65) est classé dans le groupe '5' avec une forte incidence de la maladie sur les trois variétés de tomates ; la Saint Pierre (49%), la tomate cerise (85%) et la Rio Grande avec un taux 63,15%. En définitif, selon une comparaison globale entre l'ensemble des isolats testés, la souche d'*A. tenuissima* 164 est la plus virulente avec la moyenne élevée de l'aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC) de $1026 \pm 478,67$ suivie par la souche *A. arborescens* 65 avec une moyenne de $839,66 \pm 235,18$.

L'indice moyen de nécrose est calculé pour chaque couple pathogène - variété testée présenté dans les tableaux (20 et 21). Ces résultats montrent que 3,17% des isolats d'*A. alternata* sont

en catégorie '5' (lésions sur plus de 60% des sites inoculés) et 32,14% des souches sont classées dans la catégorie '4'. La moitié des isolats (50%) sont dans la catégorie '3' et 7,14% des isolats dans la catégorie '2'. Les données indiquent une différence dans degré de virulence des souches d'*A. tenuissima* parmi lesquelles 7,54% sont en catégorie '5' et 9,43% sont regroupés dans la catégorie '4'. Les souches faiblement virulentes et non virulentes sont classées dans les catégories '3' et '2' incluant un grand nombre d'isolats estimé à 41,5 %.

L'isolat d'*A. arborescens* (65) a induit un degré élevé de maladie sur les variétés utilisées ce qui conclut l'action de la toxine AAL dûment impliquée dans la pathogenèse. Cependant, selon le (tableau 20), parmi les 27 souches d'*A. alternata* 40,74 % des souches sont classées comme virulentes avec des symptômes de brûlure aigüe. 62,96 % de celles-ci n'a pas conduit à des niveaux d'infection élevés, tandis que parmi 53 isolats d'*A. tenuissima* seulement 16,98% des isolats sont capables de produire des symptômes sévères et une majorité de 83,01% sont faiblement virulentes dans les différentes conditions testées. Les souches 156 et 164 ont montré une grande capacité à produire des lésions. La virulence des *Alternaria* à petites spores qui produisent des toxines spécifiques à l'hôte est probablement due à la forte pression de sélection issue de l'agriculture moderne utilisant des génotypes sensibles nouvellement développés, conduisant à une augmentation rapide de cette population par rapport à celles des *Alternaria spp.* à petites spores moins virulentes (Chou et Wu, 2002). Nous pensons que cette théorie est justifiée.

Par ailleurs, d'autres espèces d'*Alternaria* à grosses spores, comme *A. solani* et *A. tomatophila* envahissent les feuilles, les tiges et les fruits verts et jouent un rôle important dans la brûlure foliaire des *Solanacées* en Algérie. Ce qui fera l'objet de l'étude suivante.

2.2.2. Symptomatologie

Les différences dans l'expression des symptômes sont observées ; en effet les nécroses foliaires développées sont plus ou moins étendues (Figure 44), elles sont circulaires de couleur foncé à brune claire, se produisent seules ou en grand nombre sur les feuilles, principalement \geq à 5 mm de diamètre dans la première semaine post-inoculation. Les feuilles atteintes virent au jaune, puis au brun et tombent. Les feuilles plus âgées sont généralement touchées avant que la maladie ne s'étende aux feuilles supérieures et tiges. Des observations similaires sont reportées par Kumar et Srivastava (2013). En premier lieu, les feuilles semblaient saines, les lésions sont visibles, que lorsque les feuilles sont moins exposées à la

source de lumière. Les variations périodiques de la taille, la forme et la couleur des lésions sont également observées et les résultats sont résumés dans le tableau 22. La progression des lésions est lente au début, mais dans la troisième semaine post l'inoculation, les lésions deviennent de plus en plus apparentes, la taille maximale enregistrée est de 10,4 mm. Les taches sont de couleur foncé à brunes de même aspect que les infections naturelles en plein champs. L'apparition fréquente de petites nécroses avec un halo jaune autour conduisant parfois à une nécrose étendue entourée d'un jaunissement observé sur les feuilles atteintes, qui est supposées due aux toxines produites par l'agent pathogène (Nutsugah *et al.*, 1994). Les observations du développement périodique de la maladie sont plus ou moins identiques à ceux décrits par Stammler *et al.* (2014).

L'inoculation des variétés de tomates avec les espèces à petites de spores a provoqué des symptômes presque similaires pour chaque groupe d'isolat. Des nécroses brunes avec un halo jaune sont observées chez les souches d'*A. tenuissima* (45, 46, 59, 99, 120, 142 et 155). Des symptômes de brûlure se traduisant par des nécroses diffuses brunes avec un halo jaune ou des taches foncées suivies par un jaunissement des feuilles basales jaunes étaient très distinctifs sur les isolats d'*A. alternata* (85, 131, 156 et 167). Des nécroses brunes développées sur les bordures des feuilles avec ou sans halo jaune suivi d'un jaunissement des feuilles sont aussi observées sur les plantules inoculées avec les isolats 42, 168 et 229 d'*A. tenuissima* et les isolats d'*A. alternata* (56, 82 et 132), alors que des lésions brunes en bordures des feuilles étaient présentes sur les plantes inoculées avec 14 souches d'*A. tenuissima* (11, 20, 30, 41, 42, 81, 83, 87, 89, 138, 140, 150, 151 et 153) et 7 souches d'*A. alternata* (8, 57, 69, 79, 97, 135 et 141) ayant des symptômes typique comme ceux observés sur les feuilles naturellement infectées. Toutefois, des petites taches brunes sont observées uniquement chez des souches d'*A. tenuissima* moins virulentes (1, 51 et 70) avec un diamètre de lésion constant. La souche *A. arborescens* 65 a induit des nécroses de couleur foncée avec un halo jaune sur les feuilles et chancres brun foncé sur les tiges et aux niveaux des collets sur les trois variétés de tomates (figure 45.B), probablement par l'action de la toxine AAL.

Tableau 22: Effet des isolats à petites spores sur le développement des symptômes sur les plantules de tomates cultivées sous serre.

S. No	Espèces	Symptôme ^a	Taille des lésions ^b	S. No	Espèces	Symptôme ^a	Taille des lésions ^b
1	<i>A. tenuissima</i>	5	-	89	<i>A. tenuissima</i>	2	+
8	<i>A. alternata</i>	2	+	91	<i>A. tenuissima</i>	3	+
11	<i>A. tenuissima</i>	2	+	97	<i>A. alternata</i>	2	-
20	<i>A. tenuissima</i>	2	+	98	<i>A. tenuissima</i>	3	+
24	<i>A. tenuissima</i>	3	+	99	<i>A. tenuissima</i>	1	+
32	<i>A. tenuissima</i>	3	+	100	<i>A. alternata</i>	3	-
30	<i>A. tenuissima</i>	2	-	102	<i>A. tenuissima</i>	3	-
32	<i>A. alternata</i>	5	+	104	<i>A. tenuissima</i>	4	+
36	<i>A. tenuissima</i>	5	+	105	<i>A. alternata</i>	4	-
38	<i>A. tenuissima</i>	3	+	107	<i>A. alternata</i>	3	+
41	<i>A. tenuissima</i>	2	+	109	<i>A. tenuissima</i>	4	+
42	<i>A. alternata</i>	8	+	120	<i>A. tenuissima</i>	1	+
45	<i>A. tenuissima</i>	1	-	121	<i>A. tenuissima</i>	5	-
46	<i>A. tenuissima</i>	1	+	126	<i>A. tenuissima</i>	5	+
47	<i>A. tenuissima</i>	3	+	129	<i>A. alternata</i>	5	+
49	<i>A. tenuissima</i>	4	+	130	<i>A. tenuissima</i>	4	+
51	<i>A. tenuissima</i>	6	-	131	<i>A. alternata</i>	7	+
52	<i>A. tenuissima</i>	6	-	132	<i>A. tenuissima</i>	8	+
54	<i>A. tenuissima</i>	4	+	135	<i>A. alternata</i>	2	-
55	<i>A. tenuissima</i>	3	-	137	<i>A. tenuissima</i>	5	-
56	<i>A. tenuissima</i>	8	-	138	<i>A. tenuissima</i>	2	+
57	<i>A. alternata</i>	2	+	139	<i>A. tenuissima</i>	4	+
58	<i>A. tenuissima</i>	5	+	140	<i>A. tenuissima</i>	2	-
59	<i>A. tenuissima</i>	1	+	141	<i>A. alternata</i>	2	+
60	<i>A. tenuissima</i>	5	+	142	<i>A. tenuissima</i>	1	-
65	<i>A. arborescens</i>	5	+	143	<i>A. alternata</i>	4	+
69	<i>A. alternata</i>	2	+	150	<i>A. tenuissima</i>	2	+
70	<i>A. tenuissima</i>	6	-	151	<i>A. tenuissima</i>	2	+
71	<i>A. alternata</i>	3	+	153	<i>A. tenuissima</i>	2	+
72	<i>A. tenuissima</i>	2	+	155	<i>A. tenuissima</i>	1	+
73	<i>A. tenuissima</i>	4	-	156	<i>A. alternata</i>	7	+
75	<i>A. tenuissima</i>	5	+	157	<i>A. tenuissima</i>	4	+
77	<i>A. alternata</i>	5	+	161	<i>A. alternata</i>	4	+
79	<i>A. alternata</i>	1	+	164	<i>A. tenuissima</i>	4	+
81	<i>A. tenuissima</i>	2	+	165	<i>A. alternata</i>	4	+
82	<i>A. tenuissima</i>	8	+	167	<i>A. alternata</i>	7	+
83	<i>A. tenuissima</i>	2	-	168	<i>A. alternata</i>	8	+
84	<i>A. alternata</i>	4	+	174	<i>A. tenuissima</i>	5	+
85	<i>A. alternata</i>	7	+	194	<i>A. alternata</i>	4	-
86	<i>A. tenuissima</i>	3	+	229	<i>A. alternata</i>	8	+
87	<i>A. tenuissima</i>	2	+				

^a Symptômes: nécrose brune avec halo jaune = 1; Nécrose brune sur les bordures de feuilles = 2; Nécrose brune avec ou sans halo jaune; jaunissement des feuilles basales = 3; Nécrose brune; jaunissement des feuilles basales = 4; nécrose brune à foncée avec ou sans halo jaune = 5; Taches sombres = 6; jaunissement des feuilles basales, nécrose brune diffuse avec un halo

jaune ou des taches sombres = 7; Nécrose brune sur les bordures des feuilles avec ou sans halo jaune; jaunissement des feuilles atteintes= 8. ^b Diamètre des lésions : progression (+) ou constant (-) entre 7 et 21 jours après l'inoculation.

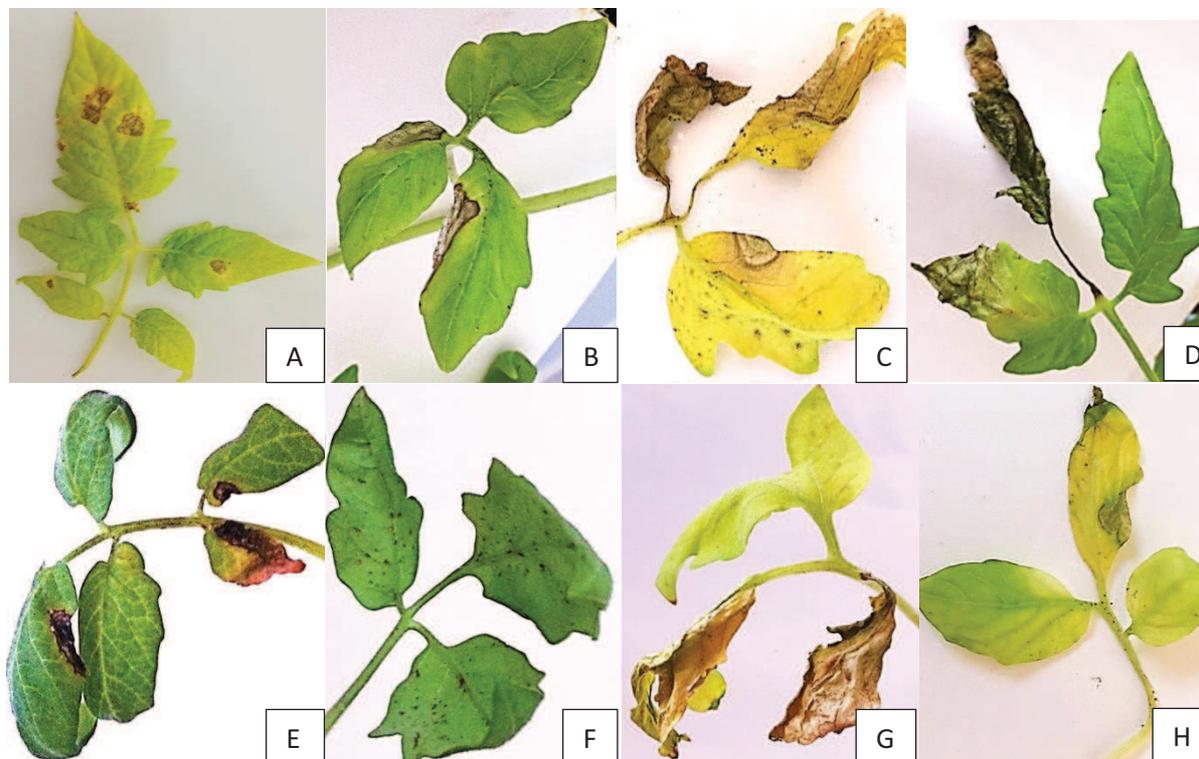


Figure 44: Symptômes observés après 21 jours post-inoculation avec les isolats de la section *alternata*. **A** : nécrose brune avec halo jaune ; **B** : Nécrose brune sur les bordures de feuilles; **C** : Nécrose brune avec ou sans halo jaune; jaunissement des feuilles basales; **D** : Nécrose brune; jaunissement des feuilles basales; **E** : nécrose brune à foncée avec ou sans halo jaune; **F** : Taches sombres; **G** : jaunissement des feuilles basales, nécrose brune diffuse avec un halo jaune ou des taches sombres; **H** : Nécrose brune sur les bordures des feuilles avec ou sans halo jaune; jaunissement des feuilles atteintes.

Les observations relatives au test de pathogénicité du champignon ont révélé l'apparition des symptômes au bout de 5 jours sur les variétés de tomate Saint-Pierre et Rio Grande. Toutefois, sur la tomate cerise les symptômes sont apparus 7 à 10 jours post inoculation. Des observations similaires ont également été enregistrées par Grogan *et al.* (1975) et Stammler *et al.* (2014) sur plants de tomates.

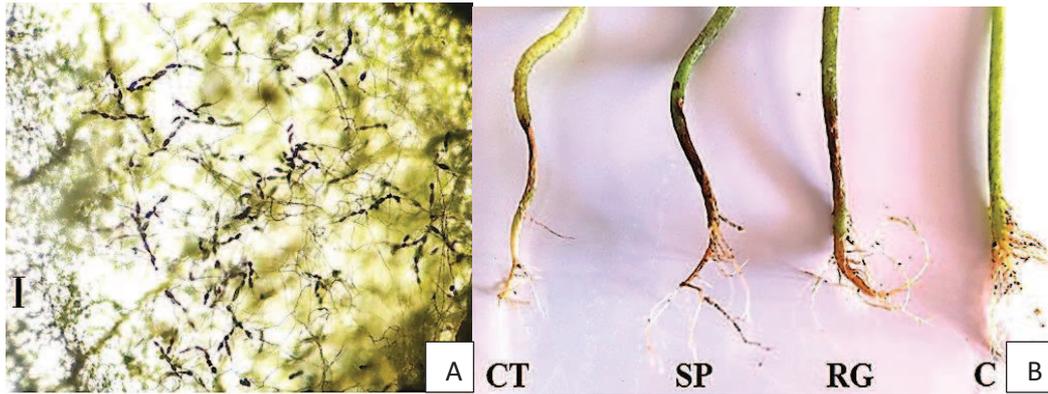


Figure 45: A. chaîne de conidies et mycélium produit sur la face supérieure de la feuille de tomate infectés par la souche *A. alternata* 156. Bar = 100 µm; B. symptômes typiques de la pourriture du collet sur trois cultivars de tomates induits par *A. arborescens* souche 65 CT: Tomates cerise, SP: Saint Pierre, RG: Rio Grande, C: Témoin.

2.3. Infections individuelles et mixtes

2.3.1. Infections individuelles

Nous avons déjà déterminé la résistance vis-à-vis de trois variétés de tomate. La mise en évidence de l'agressivité chez les souches à petites spores nous a conduit à réaliser le même type de test avec plusieurs isolats à petites et à grosses spores sur la variété sensible de tomate la plus cultivée en Algérie « Saint Pierre ». L'objectif de cette étude est de mieux comprendre les différences de pathogénicité entre les isolats de la section *alternata* et *porri*. Ceci parce l'alternariose de la tomate est causée par plusieurs espèces telle qu'*A. tomatophila*, *A. solani* et *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, celles-ci sont parfois confondus avec la maladie du blackmold (pourriture noire). Pour cela 19 isolats d'*A. alternata*, 23 isolats d'*A. tenuissima*, 36 isolats d'*A. tomatophila* et 5 isolats d'*A. solani* sont évaluées et comparés (Tableau 23). L'agressivité des isolats est exprimée par l'indice moyen de nécrose, calculée pour chaque couple pathogène – hôte. Ces mesures d'indice nous ont permis de révéler des différences d'agressivité entre les isolats testés sur plantules de tomates (Figure 46).

Tableau 23 : variabilité du pouvoir pathogène des *Alternaria* du groupe *alternata* et *porri* sur plantules tomates.

No. S	Les espèces du groupe <i>alternata</i>			No. S	Les espèces du groupe <i>porri</i>			No. S	Infections mixtes (<i>porri</i> + <i>alternata</i>)		
	7 Jpi	14 Jpi	21 Jpi		7 Jpi	14 Jpi	21 Jpi		7 Jpi	14 Jpi	21 Jpi
1	4,89	14,04	21,48	198	47,05	68,13	73,97	198 + 165	65,45	86,16	89,12
8	17,20	19,90	24,35	201	20,42	39,2	42,9	198 + 79	63,11	71,55	83,89
11	2,35	8,29	8,89	205	9,53	22,9	26,62	198 + 97	47,65	54,94	60,26
38	2,50	13,05	16,57	207	26,5	34,91	42,31	208 + 165	39,56	68,38	72,9
41	10,29	11,74	19,68	208	23,14	40,78	45,73	208 + 79	56,73	59,71	68,24
42	4,73	5,91	8,41	209	63,07	86,78	94	208 + 97	10,81	31,75	57,17
45	1,78	3,07	5,38	210	66,22	73,7	91	223 + 165	42,78	52,83	74,83
57	7,72	9,09	15,19	211	8,62	21,93	27,76	223 + 79	49,91	93,22	95,83
66	23,71	36,81	40,15	213	56,27	79,57	89,72	223 + 97	51,38	70,55	76,08
71	12,01	20,31	25,97	217	36,57	44,74	68,07	236 + 165	16,49	22,61	27,7
72	17,00	35,70	57,05	218	38,22	57,77	82,94	236 + 79	48,57	50,27	51,42
75	13,02	26,21	43,28	220	47,99	64,83	84	236 + 97	34,31	39,84	42,53
77	3,08	3,83	9,99	223	4,2	21,47	32,62	241 + 165	65,6	67,98	79,55
79	9,23	19,48	23,21	236	42,05	56,07	72,74	241 + 79	59,52	81,03	89,17
81	10,51	18,96	24,96	240	31,85	43	44,8	241 + 97	54,06	71,22	83,68
85	5,52	18,88	26,01	241	62,86	78	75,13	248 + 165	21,51	35,14	52,41
86	2,85	6,91	8,59	242	74,53	78,06	91,33	248 + 79	22,46	30,01	35,04
87	6,54	13,96	15,17	243	30,43	55,91	74	248 + 97	21,89	59,6	61,38
89	12,37	16,26	18,53	244	33,61	52,62	61,01	250 + 165	36,15	47,96	68,04
91	3,11	4,10	10,29	248	42,69	51,23	55,54	250 + 79	58,96	74,57	82,17
97	13,45	14,90	16,93	249	23,83	43,69	51,53	250 + 97	62,78	68,44	75,01
98	11,48	16,35	21,55	250	67,78	81,67	84,33	254 + 165	82,22	97	100
99	4,57	18,98	22,52	252	34,59	41,17	57,03	254 + 79	50,39	70,84	79,84
100	12,46	21,82	27,90	254	22,78	27,69	33,54	254 + 97	51,19	58,45	78,66
107	4,40	5,38	8,79	256	9,13	18,37	22,73	266 + 165	56,66	57,48	59,43
109	2,26	3,83	17,64	257	11,19	16,33	25,8	266 + 79	19,85	50,86	72,22
120	3,03	14,15	20,33	259	37,73	39,09	56,22	266 + 97	24,03	26,97	34,75
125	29,43	33,38	34,60	260	80	93,78	98,33	272 + 165	77,42	80,78	82,94
126	19,91	34,81	50,68	261	69,99	83,67	95	272 + 79	37,94	58,08	76,83
129	15,51	20,18	23,31	262	30,66	34,05	36,91	272 + 97	24,49	43,02	51,91
140	10,71	14,47	23,22	264	25,54	44,49	56,38	292 + 165	41,18	67,33	74,17
150	1,25	1,57	4,21	265	39,3	41,51	69,37	292 + 79	18	43,09	49,11
151	7,71	8,74	19,20	266	55,66	69,24	85,78	292 + 97	16,22	38,42	41,25

153	1,32	2,74	7,14	272	57,89	96,22	91,67	294 + 165	84,34	88,33	90,45
155	1,66	3,10	8,85	276	11,58	19,9	24,39	294 + 79	46,16	59,89	81,33
156	2,60	4,00	8,74	277	26,48	43,03	61,5	294 + 97	29,09	74,88	78,7
157	3,34	4,99	12,66	292	69,14	77,33	83,35	298 + 165	22,65	33,71	45,77
161	2,20	9,34	41,84	294	82,03	83,03	99,67	298 + 97	74	76,5	92,44
164	6,17	26,24	30,10	296	34,8	56,35	69	298 + 79	35,49	54,19	65,07
165	15,50	22,52	33,59	298	62,94	87	92,22	307 + 165	51,97	81,67	86,37
269	4,71	9,75	16,97	307	38,27	76,22	77,19	307 + 79	49,89	75,11	82
302	2,79	3,88	5,69					307 + 97	39,31	65,93	91,83

La maladie progresse lentement les premiers jours mais s'accélère au fur et à mesure pendant la première semaine post inoculation ce qui entraîne une courbe de progression de la maladie typique. L'incidence de la maladie étant toujours en corrélation positive, ce qui est dû à l'infection de nouvelles feuilles après la deuxième et troisième semaine post inoculation. Selon le tableau (23), parmi les isolats à petites spores un seul isolat (72) est classé dans la catégorie « 5 », seulement 19% sont groupés dans la catégorie «4», 42% sont classés en catégorie « 3 » et 14% des isolats étaient moins virulents sont classés dans le groupe « 2 » avec une incidence de maladie inférieure à 20 % sur les plantes inoculées. L'incidence minimum de 4,21% est enregistrée avec l'isolat (150) qui correspond à la catégorie «1».

Nous avons remarqué que lorsque les plantules sont inoculées avec des concentrations moins élevées que le test précédent (10^4 au lieu de 10^5 spores/ml), cela n'a pas conduit à l'apparition de plusieurs lésions avec une incidence moyenne de maladie légèrement inférieure au test précédent chez les mêmes isolats à petites spores testés.

Les espèces du groupe *porri*, par contre, ont créé des lésions beaucoup plus grandes pour la majorité des souches testées. Les résultats montrent une l'incidence maximale de la maladie enregistrée avec l'isolat (294) suivi par (260) avec 99,67% et 98,33% respectivement. Plus de 58% des isolats d'*A. tomatophila* sont classés dans la catégorie « 5 » (avec plus de 60% de la surface nécrosée) provoquant des lésions sévères au niveau des tiges et collets qui ont conduit à la mort des plantules, 20% des isolats sont groupés dans la catégorie « 4 » infligeant des brûlures sévères au niveau du feuillage. 22% des isolats sont classés dans la catégorie « 3 ». Bien que la pathogénicité soit enlevée, l'isolat (256) a enregistré un taux de maladie minimum (22,73%) par rapport aux autres isolats d'*A. tomatophila* testés. Les données indiquent les isolats d'*A. solani* sont également pathogènes pour les tomates avec

un degré de virulence élevé, trois isolats (266, 250 et 292) sont classés dans la catégorie « 5 », et deux isolats (248 et 249) sont classés dans la catégorie « 4 ».

Les premiers symptômes sont apparus sous forme de petites taches irrégulières circulaires sur les feuilles inférieures et mesurent 1 à 3 mm pour les espèces à petites spores et 5 à 15 mm pour les espèces à grosses spores. Les nécroses provoquées par les isolats à grosses spores sont précoces par rapport aux isolats à petites spores (elles sont observées les 2^{me} ou 3^{eme} jours post inoculation), elles se développent et fusionnent en formant de grandes lésions nécrotiques avec des anneaux concentriques. Les lésions observées sur les feuilles et les tiges sont diffuses, brunes foncées, souvent entourées d'un halo chlorotique ou un jaunissement. Des lésions sévères au niveau des collets induisant la mort de la plante 7 jours post inoculation est probablement dû à la sécrétion de toxine (s) par l'agent pathogène. Langsdorf *et al.* (1991) ont montré que les toxines sont libérées au cours de la germination des spores d'*A. solani* et peuvent jouer un rôle déterminant dans l'infection. D'autre part, Shahbazi *et al.* (2011) ont constaté que l'augmentation de la sensibilité aux phytotoxines produites par *A. solani* est corrélée à une susceptibilité accrue à l'agent pathogène. Peu d'études comparant *A. tomatophila* et *A. solani* ont été réalisées, parmi, ceux de Frazer et Zitter (2003) qui ont montré que ces espèces sont à la fois des pathogènes de la tomate et la pomme de terre, *A. tomatophila* était plus virulente sur les plantes de tomates qu'*A. solani*. Les mêmes résultats sont rapportés par Gannibal *et al.* (2014) qui ont aussi corrélé ces différences à une variabilité moléculaire.

Les agents pathogènes des plantes expriment généralement plusieurs fonctions de virulence qui augmentent leur capacité à coloniser les plantes hôtes en fonction de leur âge. La variabilité de virulence a été signalée chez *A. solani* (van der Waals *et al.*, 2004 ; Kumar *et al.*, 2008), *A. alternata* (Anand, 2002 ; Slavov *et al.*, 2004 ; . Hubballi *et al.*, 2011) et chez *A. tomatophila* (Rodrigues *et al.*, 2010 ; Gannibal *et al.*, 2014). Les espèces *A. solani* et *A. tomatophila* sont reconnus comme les véritables agents pathogènes de la tomate et de la pomme de terre (Simmons, 2000 ; Rodrigues *et al.*, 2010 ; Gannibal et Orina, 2013), *A. alternata* est par contre souvent considéré comme un saprophyte ou un parasite de faiblesse (Hooker *et al.*, 1981 ; Spoelder *et al.*, 2013). Cependant, Droby *et al* (1984) et Mirkarimi *et al.* (2013) ont noté *A. alternata* comme étant l'agent causal de taches brunes sur le feuillage de la pomme de terre et tubercules. *A. alternata* a également été citée comme la cause de la tache noire et de chancres sur tige sur la tomate (Grogan *et al.*, 1975). Dans de nombreuses régions algériennes, les pommes de terre et les tomates sont cultivées dans des parcelles relativement

proches, ainsi l'inoculum d'*A. solani* a du s'étendre à jusqu'à atteindre les feuilles de tomates. Chou et Wu (2002) confirment que la capacité des espèces *Alternaria* à bec filamenteux à produire des toxines spécifiques non- hôte résulte éventuellement d'une longue période de coévolution entre hôte- pathogène.

Les souches d'*A. tomatophila* (256) et (276) semblent avoir un pouvoir pathogène limité par rapport aux autres souches à grosses spores. Toutefois les plantules contaminées ont présenté des nécroses du collet et des taches brunes typiques. Du moins pour ces souches, le niveau d'agressivité semble lié à leur aptitude à sporuler, cette corrélation ayant été déjà observée par Kumar (2008) pour les espèces *A. solani*. Or il est connu que l'espèce *A. tomatophila* ne donne souvent que du mycélium stérile (Simmons, 2007). De plus, les souches d'*Alternaria* conservées en mycothèque évoluent vers un thalle plus luxuriant et avec une diminution progressive de la capacité de sporulation. Chez les *Alternaria* pathogènes, le taux de sporulation décroît assez rapidement en culture puis reste faible jusqu'à devenir nulle (phase stérile) (Simmons, 1992 ; Rotem, 1994 ; Andersen *et al.*, 2008). Le passage de la phase normale (mycélium restreint et sporulation abondante) vers la phase stérile (mycélium abondant et capacité de sporulation nulle) passe par une phase intermédiaire qui est plus variable. Ces passages sont brusques et ils apparaissent soit à l'occasion de repiquage, soit chez la même culture en phase de croissance. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces changements de phase : déficiences alimentaires, mutation, variation non chromosomiques. La fréquence de l'apparition de la phase intermédiaire est proportionnelle au pouvoir pathogène (Iacomi, 2001). Par contre, l'apparition de la phase stérile s'accompagne toujours à la perte du pouvoir pathogène. En particulier, l'espèce *A. tomatophila* devient rapidement stérile après quelques repiquages sur milieu artificiel, présentant souvent seulement un thalle de couleur pale. De ce fait, on peut supposer que la phase d'évolution vers la stérilité au moins pour certains isolats d'*A. tomatophila* pourrait expliquer leur faible agressivité observée sur plantules de tomate.

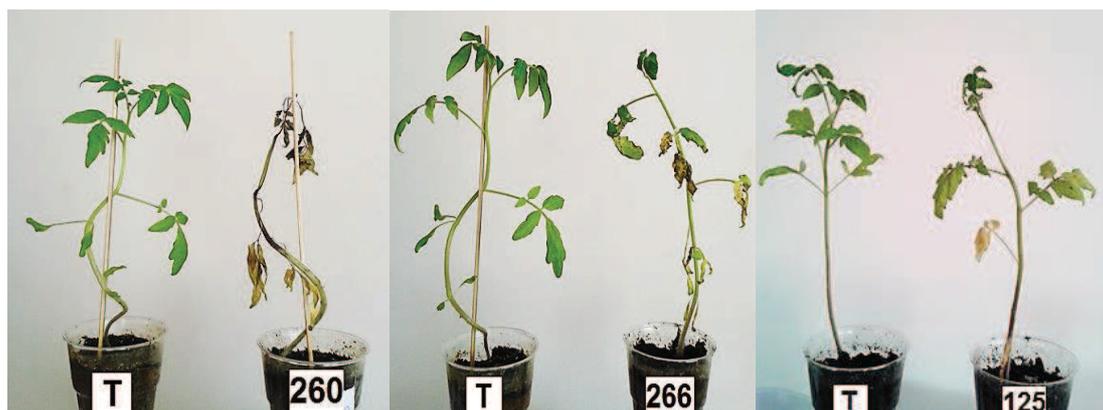


Figure 46: Pathogénicité d'*A. tomatophila*, *A. solani* et *A. alternata* sur plantules de tomates 7 jours après l'inoculation (de gauche à droite).

2.3.2. Infections mixtes

La plus part des modèles de développement épidémiques se rapportent à un parasite donné, alors que la plus part des cultures sont attaquées par un complexe parasitaire, constitué d'agents différents ou de différentes espèces d'un même genre, le cas des *Alternaria* pathogènes des *Solanacées*, celles-ci pouvant interagir entre elles. Sur la base de cette hypothèse et pour la simulation du complexe pathogène des principaux agents de la brûlure foliaire, nous avons analysé les données de l'incidence de la maladie des deux groupes d'espèces en inoculations mixtes. Si à la fois les espèces du groupe *porri* et celles du groupe *alternata* sont pathogènes, la présence d'un groupe d'espèces dépendrait de la présence ou de l'absence de l'autre. La quatrième colonne du tableau 23 représente les valeurs des résultats de trois souches appartenant au groupe *alternata* testées chacune avec 14 souches du groupe *porri*.

L'apparition et le développement des symptômes sont suivis en dynamique pour chaque complexe pathogène testé puis comparés aux inoculations individuelles de chaque espèce. Des symptômes sévères sont observés sur la plus part des plantules traitées par des inoculations mixtes (Figures en annexe 6), qui sont transformés en indices de nécrose traduisant l'agressivité des isolats testés (figures 47 et 48).

Les données (Tableau 23) montrent que les 14 inoculations mixtes avec les espèces de la section *alternata* ne conduisent pas à une sévérité accrue de la maladie lorsqu'ils sont associés à *A. solani* et *A. tomatophila* (moins de 10% de différence) donc une absence d'antagonisme par les deux champignons. Des résultats similaires avec les mêmes méthodes d'inoculation ont été reportés par Spoelder *et al.* (2013) sur plantes de pomme de terre inoculées avec *A. solani*

et *A. alternata*. Dans ce cas de figure les isolats de la section *alternata* apparaissent indépendants de ceux du groupe *porri*, n'ayant aucun effet sur l'incidence de la maladie ce qui confirme que les espèces à petites spores sont des opportunistes pouvant vivre dans les tissus affaiblis.

Cependant, une forte augmentation de l'incidence de la maladie est enregistrée dans 26,9% des complexes pathogènes testés. L'incidence de la maladie semble corrélée avec le degré de virulence des espèces à grosses spores, dans tous les cas les trois souches à petites spores ont eu un effet synergique avec les isolats du groupe *porri* ayant une incidence de maladie inférieure à 50%. Les mêmes résultats ont été rapportés par Bashan *et al.* (1991) sur la pathogénicité d'*A. macrospora* et association avec *A. alternata* sur des plants de coton. L'effet synergique est dû à la combinaison de toxines secrétées par les deux isolats. Des études ont rapporté que l'espèce *A. solani* produit de l'acide alternarique (qui existe dans les spores dormantes), qui est libéré lors la germination des spores (Langsdorf *et al.*, 1990), il a été noté aussi que l'acide alternarique n'est pas phytotoxique lorsqu'il est pulvérisé seul sur des feuilles de tomate, mais il améliore le processus de l'infection et l'apparition des symptômes de nécrose lorsqu'il est ajouté à une suspension de spores d'*A. solani* (Langsdorf *et al.*, 1990). Un autre facteur chez les spores d'*A. solani* est nécessaire pour l'infection. Une substance nommée S1, n'étant pas toxique mais présente dans une fraction hydrosoluble des extraits chloroforme à partir du fluide de germination des spores. Ce facteur a permis aux spores d'une souche non pathogène d'*A. alternata* à causer des symptômes nécrotiques sur la tomate et la pomme de terre (Langsdorf *et al.*, 1990 ; Chaerani et Voorrips, 2006).

D'autre part, les résultats montrent que 13 sur 42 inoculations mixtes ont révélé une diminution considérable de la maladie, une réduction de 61,92% dans le complexe (236+165) et une réduction de 59,49% dans le complexe (97+266) ce qui conduit à une compétition entre les deux isolats. Cet effet de compétitions est observé entre les souches du groupe *porri* ayant un niveau élevé de virulence, supérieur ou égale à 80%. Parmi les trois souches à petites spores, la souche *A. alternata* 97 semble plus compétitive par rapport aux souches d'*A. tenuissima* (45) et (165). Dans ce dernier cas, un mécanisme différent est peut-être en fonctionnement; l'antagonisme peut être responsable de la protection plutôt que d'une interaction hôte-pathogène. Van den Heuvel (1971) a rapporté que le champignon saprophyte *A. tenuissima* était antagoniste à l'agent pathogène *A. zinniae* sur le haricot, ce qui a conduit à un effet protecteur; il a suggéré qu'une substance produite par *A. tenuissima* a inhibé la germination des spores d'*A. zinniae*. Spurr (1977) a noté également un comportement

similaire dans lequel une souche d'*A. alternata* non-pathogène appliquée aux feuilles de tabac avant l'inoculation avec la souche pathogène *A. alternata* a réduit l'infection de 60% dans des inoculations en laboratoire. Dans le même ordre d'idée, Musetti *et al.* (2007) ont constaté qu'*A. alternata* est un mutualiste de défense contre l'agent du mildiou *Plasmopara viticola* de la vigne.

La subsistance des *Alternaria* à petit-spores leur a permis d'élaborer des stratégies de survie différentes dans leurs niches écologiques. Certains sont saprophytes cosmopolites, tandis que d'autres sont pathogènes des plantes ou opportunistes, et endommagent gravement leurs hôtes avec des toxines spécifiques à l'hôte (Rotem, 1994 ; Roberts *et al.*, 2000 ; Chou et Wu, 2002).

Ces résultats nous ont permis de mieux comprendre le rôle et le comportement des espèces à petites spores faiblement ou non virulentes dans la gravité et l'incidence de la maladie qui semble dépendre de la présence et /ou de la virulence des espèces à grosses spores, dans la plus part des cas.

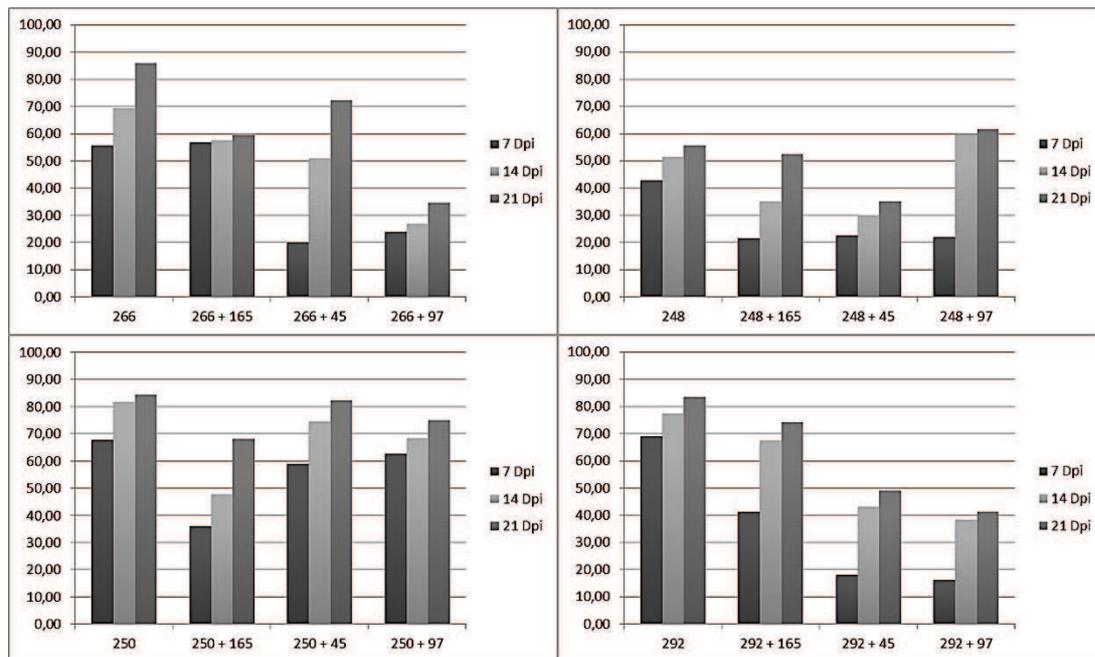


Figure 47 : infections mixtes et individuelles sur plantules de tomate avec isolats d'*A. solani* et de la section *alternata*.

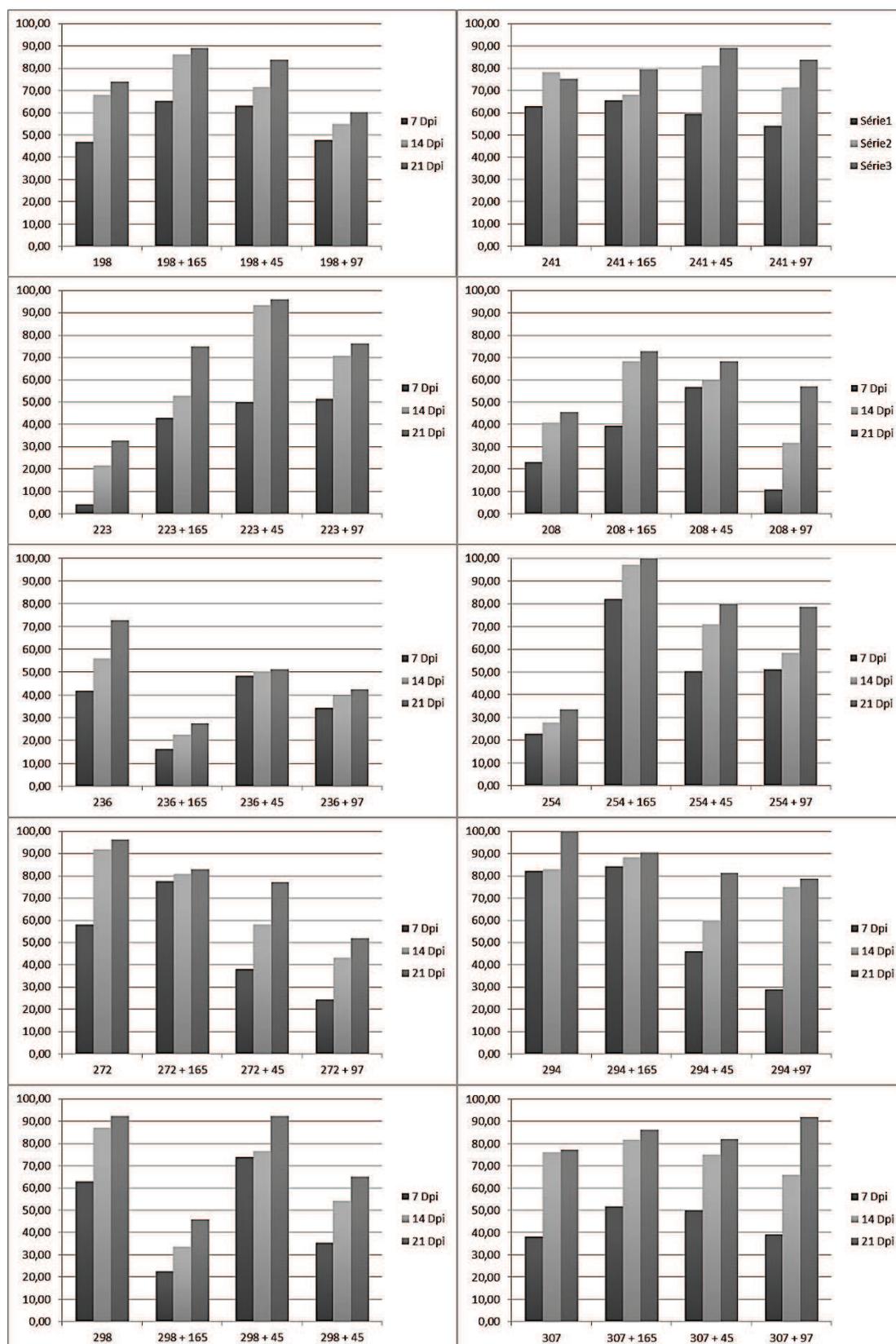


Figure 48: infections mixtes et individuelles sur plantules de tomate avec les isolats d'*A. tomatophila* et de la section *alternata*.

En effet, nous avons confirmé notre hypothèse du complexe pathogène d'*Alternaria* qui est à l'origine de la brûlure foliaire des *Solanaceae*. De plus, il existe *in vivo* une flore microbienne qui peut modifier l'expression du pouvoir pathogène de ces *Alternaria* impliqué dans la brûlure foliaire. Cette flore, parasite ou saprophyte, peut avoir différentes origines (le sol, l'air ou les semences), les phénomènes de compétition ou une possible synergie peuvent intervenir aux différents stades de l'infection et influencer les *Alternaria* pathogène et les *Alternaria* supposés saprophytes. Ce phénomène a été signalé chez la pomme de terre et la tomate où interviennent les espèces *A. solani* et *A. alternata* (Kuczynska, 1992 ; Orina *et al.*, 2012 ; Stammler *et al.*, 2014). D'autres cas ont été reportés l'alternariose des crucifères qui est due à un complexe d'espèces comme *A. brassicae*, *A. brassicicola* et *A. raphani* (Iacomi *et al.*, 2001).

Alors que nos expériences étaient relativement simples, elles sont importantes. Dans la pratique agricole, les agriculteurs n'appliquent pas les fongicides spécifiquement sur les plantes présentant un début de symptômes (taches foliaires provoqués sur feuilles âgées), nos résultats indiquent que cela est nécessaire sachant que plusieurs espèces sont agressives et induisent des dégâts considérables sur les cultures de *Solanacées*. Ces résultats sont confirmés par Spolder *et al.* (2013). Par ailleurs, d'autres causes des taches foliaires, comme les dommages causés par l'ozone et les carences peuvent aussi présenter un danger dans le rendement de ces cultures maraîchères.

2.3.3. Postulats de Kock

Le postulat de Koch fait appel à un ensemble de techniques nécessaires pour la détection et l'identification du pathogène *in situ*. Nous avons procédé à un ré-isolement des espèces à partir des feuilles de tomates inoculées puis à la comparaison avec les cultures mères.

L'examen de la surface des échantillons de plantes infectées, à la loupe binoculaire et au microscope, nous a permis de mettre en évidence les critères de sporulation du pathogène ce qui a confirmé le diagnostic des résultats. De grandes densités de conidiophores et conidies sont produites sur les fragments prélevés représentant des nécroses. Nous avons observé que les conidies collectées à partir des lésions sur feuilles et tiges étaient toujours plus grandes et de taille uniforme par rapport à ceux sur milieux synthétiques (Figure 49). Elliott (1917) et Hartill (1968) ont signalé des observations similaires ; ils ont rapporté que les conidies issues des échantillons prélevés à partir de chancre des tiges et lésions sur feuilles sont de taille plus grande par rapport à celles cultivées sur milieu artificiel, ceci peut être dû aux effets

combinés du substrat, de l'humidité ambiante, et des températures de nuit basses. D'ailleurs, les conidies produites *in vitro* sur milieux de cultures incubées à une température constante ont un bec 3.4× moins long que ceux produits *in vivo*. Neergaard (1945) a également observé que les conidies d'*A. tenuis* syn. *alternata* sur leurs milieux naturels (graines, semis, ou des feuilles affaiblies) avait des becs plus minces que ceux des milieux synthétiques. Grogan *et al.* (1975) et Misaghi *et al.* (1978) ont confirmé les mêmes résultats sur la taille des spores d'*A. alternata* f. sp. *lycopersici* produites *in vitro* sur milieux de cultures artificiels qui étaient généralement plus petites, avec un bec plus court, et de tailles et formes très variables par rapport à celles collectées à partir des chancres de tiges des tomates. Selon Simmons (1986), la description originale des espèces d'*Alternaria* est basée sur des mesures de conidies produites sur un substrat naturel dans des conditions environnementales variables. En effet, dans nos expériences, les conidies des isolats de la section *alternata* et *porri* issues des lésions sur plantes de tomate correspondent à cette description assez bien.

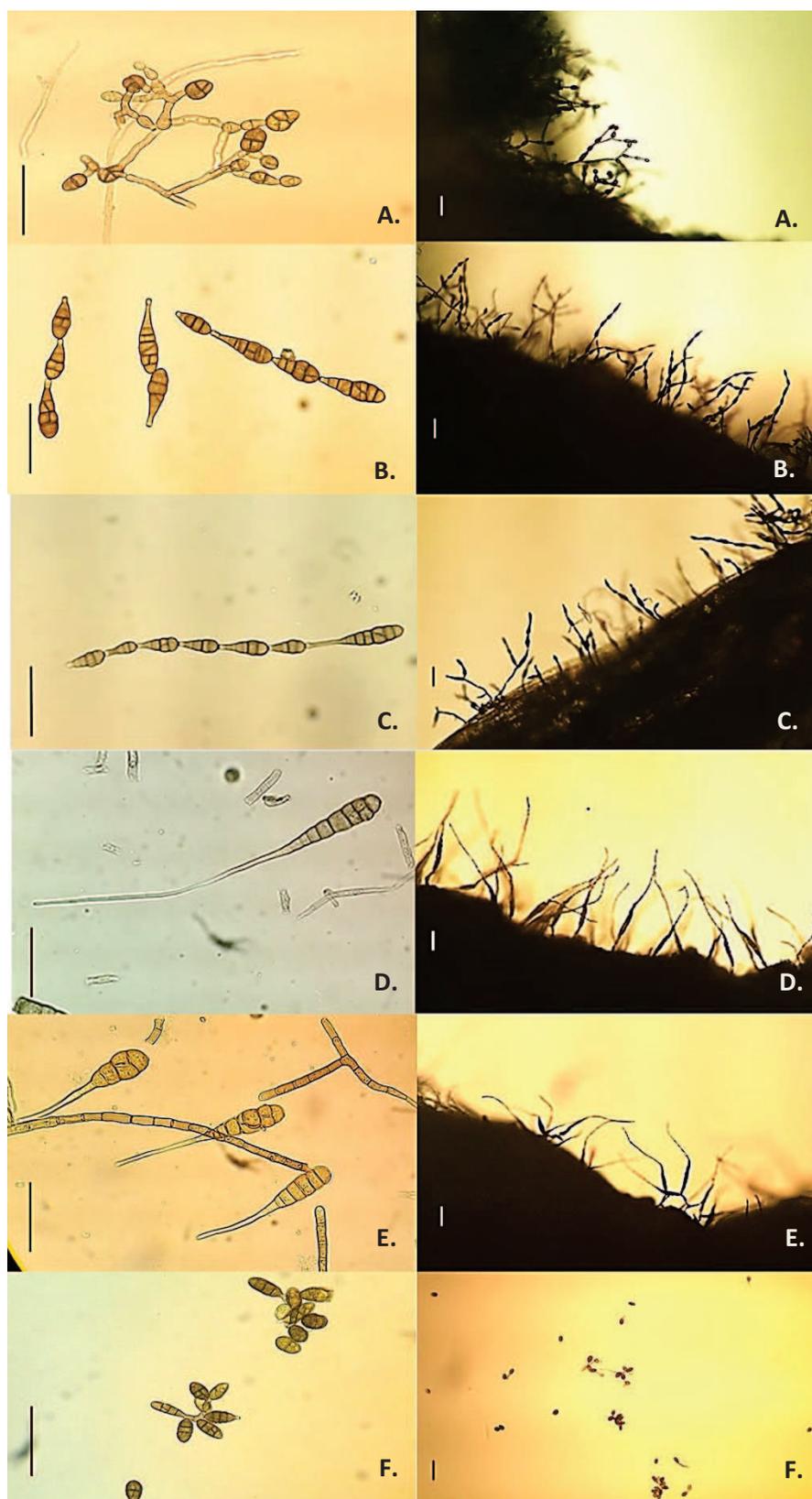


Figure 49: Sporulation sur tissus de tomates infectées issues des inoculations en laboratoire. **A.** *A. arborescens* ; **B.** *A. alternata* ; **C.** *A. tenuissima*. **D.** *A. tomatophila* ; **E.** *A. solani* ; **F.** *A. consortialis*. Bars= 50µm.

2.3.4. Détection moléculaire d'*Alternaria sp.*

Sur la base des résultats précédents et en utilisant la même technique d'extraction d'ADN à partir des échantillons de tissus infectés, des tests PCR sont réalisés sur des feuilles de tomates artificiellement contaminés par les différentes espèces *Alternaria* et avec différentes combinaisons d'inoculum au 21^{ème} JPI. La quantité de l'ADN extrait est vérifiée par le couple d'amorces universelles ITS1F/ITS4. Ces amorces permettent comme le montre la figure (50 A) de s'assurer de la présence d'ADN amplifiables.

Les amplifications avec les amorces (OAsF7/R6), (OAtF4/R2) et (AAF2/R3) ont généré des signaux fluorescents distincts pour tous les échantillons de feuille infectées avec leurs espèces respectives. La détection des espèces d'*A. tomatophila*, *A. solani* et ceux de la section *alternata* est confirmée par les produits d'amplification en présence de témoins positifs pour chaque espèce comme ceux représentés dans les figures 50 B, C et D. Aucune amplification n'est détectée dans les tissus de témoins inoculés par l'eau distillée stérile. Ces résultats prouvent une absence totale de contaminants et que les symptômes sont bien provoqués par leur pathogènes respectifs, ce qui confirme les postulats de Kock.

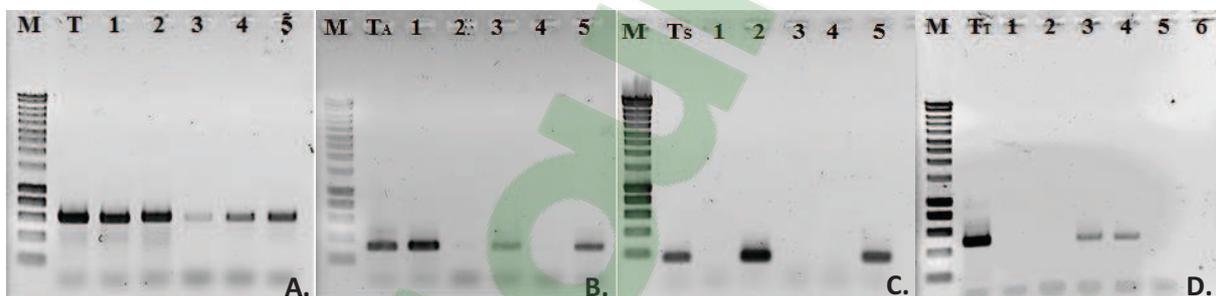


Figure 50: Détection des espèces d'*Alternaria* à partir de feuilles de tomates inoculées pendant 21 jours. **A.** amplification avec les amorces universelles ITS1F/ ITS4 ; **B.** amplification avec les amorces spécifiques d'*A. tomatophila* (OAtF4/ OAtR2) ; **C.** amplification avec les amorces spécifiques d'*A. solani* (OAsF7/ OAsR6) et **D.** amplification avec les amorces spécifiques des *Alternaria* à petites spores (AAF2/ AAR3). **T** : témoin, **T_A** : *A. alternata*, **T_S** : *A. solani*, **T_T** : *A. tomatophila*, piste **1** : 165, piste **2** : 250, piste **3** : 307+97, piste **4** : 307 et piste **5** : 250+165. **M** =marqueur de taille.

V. Lutte chimique

1. Analyse de la sensibilité osmotique

Dans le but d'identifier un éventuel effet d'osmo-tolérance des souches, des tests de croissance radiale sont réalisés sur milieu PSA contenant du NaCl à 2% et 4%. Les résultats montrent qu'à une concentration de 4%, une inhibition élevée de la croissance de la majorité des souches est observée, à cette concentration une distinction entre les souches sensibles et tolérantes se désigne, des taux d'inhibition allant de 12.7% à 62.8% sont observés (Tableau 24 et Figure 51).

Tableau 24: taux d'inhibition de la croissance mycélienne chez les isolats de la section *alternata* sur milieu PSA+ 2%NaCl et PSA+ 4%NaCl.

Isolats	NaCl 2%	NaCl 4%	Isolats	NaCl 2%	NaCl 4%
A1	30,33	59,24	A17	40,43	48,63
A2	55,28	62,82	A18	40,99	51,42
A3	16,61	26,01	A19	38,94	56,84
A4	44,28	48,84	A20	37,14	47,89
A5	3,38	12,76	A21	43,13	48,28
A6	48,32	62,72	A22	34,53	48,64
A7	25,07	28,02	A23	32,74	42,77
A8	45,02	60,44	A24	28,83	33,86
A9	44,41	58,80	A25	44,01	45,93
A10	30,57	56,39	A26	38,21	50,78
A11	8,88	28,28	A27	39,54	40,39
A12	47,33	55,33	A28	28,74	48,06
A13	41,04	51,54	A29	4,96	22,18
A14	14,32	22,61	A30	50,84	60,29
A15	33,11	37,12	A31	46,22	44,26
A16	52,85	58,00	A32	21,17	35,76

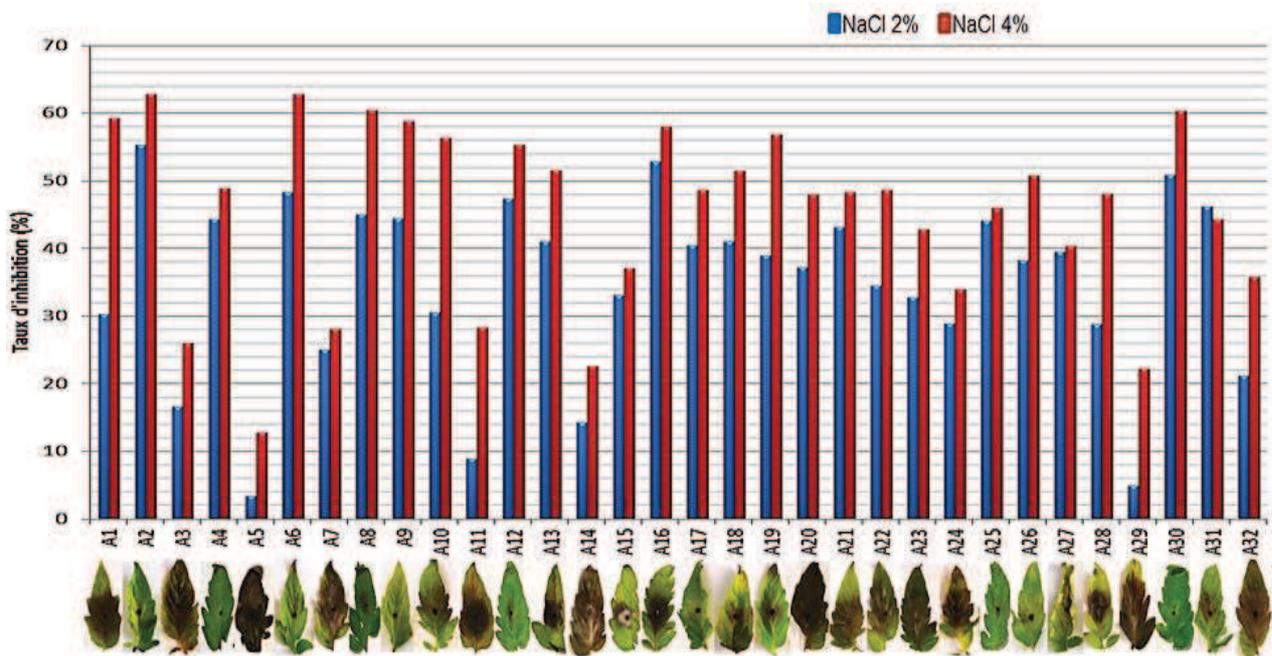


Figure 51: Effet du NaCl à 2% et 4% sur la croissance mycélienne des souches de la section *alternata* après six jours d'incubation.

Les souches appartenant aux deux espèces incluant trois souches d'*A. alternata* (A21, A22 et A31) et quatre souches d'*A. tenuissima* (A20, A25, A27 et A28) sont classées comme modérément sensibles au NaCl 4% avec un pourcentage d'inhibition entre 40,3% et 48,8%. Les souches fortement sensibles au stress osmotique, dont huit souches d'*A. alternata* (A2, A10, A12, A13, A16, A19, A26 et A30) et sept souches d'*A. tenuissima* (A1, A4, A6, A8, A9, A17 et A18), ont un taux d'inhibition entre 50,7% et 62,8% et ce qui représente la majorité des souches faiblement virulentes sur folioles de tomates détachées mentionnés dans le tableau (19). A l'inverse, les souches tolérantes ayant une osmo-sensibilité relativement faible avec une moyenne entre 12,7% et 35,7% dont cinq souches d'*A. tenuissima* (A3, A5, A7, A14 et A29) et quatre souches d'*A. alternata* (A11, A15, A24 et A32) représentent en majorité les souches virulentes ou moyennement virulentes. A l'exception de la souche pathogène *A. arborescens* A23 est modérément affectée par le stress osmotique, avec un pourcentage d'inhibition qui varie entre 41,04% sur NaCl à 2% et 51,54% sur NaCl à 4%.

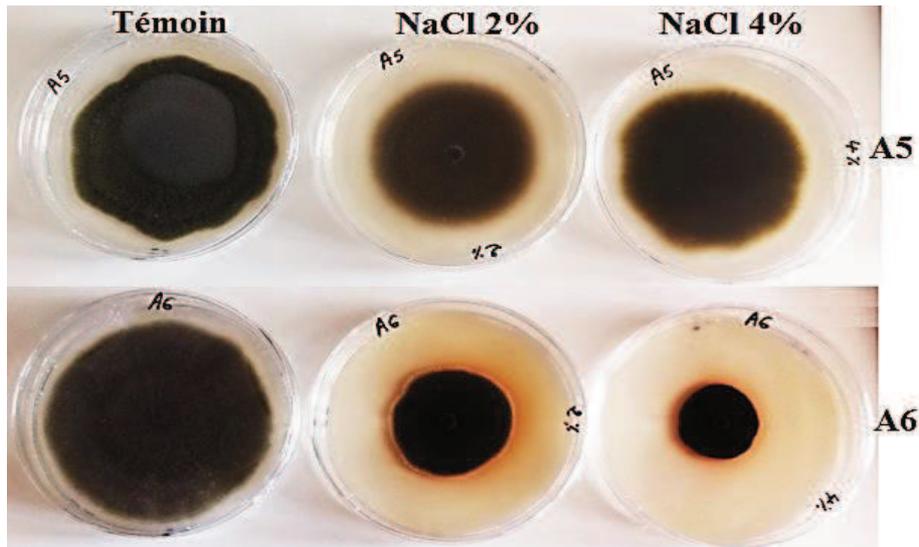


Figure 52: Sensibilité osmotique des isolats de la section *alternata*; A6 osmo-sensible et A5 osmo-tolérante.

La survie d'un champignon dépend nécessairement de sa capacité à s'adapter aux contraintes extérieures telles que le changement d'osmolarité, de la température ou encore maintenir une barrière physique contre les défenses de la plante hôte durant une infection, cette adaptation est liée à la voie de l'intégrité membranaire (Zarsov *et al.*, 1997 ; Avenot, 2003). Il existe de forts liens entre cette voie de signalisation et la voie de régulation osmotique appelée voie HOG (High Osmolarity Glycerol) qui permet à la cellule fongique de croître dans un environnement hypertonique en compensant la différence de pression avec une accumulation de glycérol (Attfield, 1997 ; Avenot, 2003). L'étude de la sensibilité osmotique des isolats de la section *alternata* a révélé une variabilité considérable qui s'avère liée à leur pathogénicité. Cette osmo-sensibilité peut être un élément déterminant pour la sélection de souches résistantes aux fongicides (Avenot, 2003), ce qui fera l'objet des tests fongicides dans l'étude suivante.

2. Sensibilité vis-à-vis certaines matières actives

Le Tableau 25 met en évidence une variabilité de résistance des souches vis-à-vis des matières actives testées appartenant à la famille des dithiocarbamates. La majorité de ces substances sont inefficaces sur la croissance mycélienne de la souche A11 qui est résistante ayant un taux d'inhibition inférieur à 50% pour les trois concentrations (50, 100 et 250 ppm) (Figure 54). Cependant, elle est moins résistante aux substances MA7 (CI₅₀ <375) et MA9 (CI₅₀ <300) au cours de sa croissance. Ces substances (MA7 et MA9) ont donné aussi de meilleurs résultats pour l'inhibition de la croissance mycélienne de la souche A2 (CI₅₀<280)

et ($CI_{50}<300$) tout comme les substances MA3 et MA4 ($CI_{50}<250$) et ($CI_{50}<375$). L'isolat A2 montre également une résistance importante vis-à-vis des autres matières actives dont l'inhibition est inférieure à 50% sur les concentrations 50 et 100 ppm (Figure 53).

En conclusion, les substances MA8, MA2, MA1, MA6 et MA5 ne permettent pas de contrer la croissance mycélienne des deux souches étudiées avec une $CI_{50}>500$ ppm, elles sont donc très résistantes.

Tableau 25: Concentrations inhibitrices (ppm) de la croissance mycélienne des souches A2 et A11 en présence des neuf fongicides testés après six jours de culture sur milieu PSA à 25°C.

Matières actives	Souche A11 CI_{50}	Souche A2 CI_{50}
MA1	>500	>500
MA2	>500	>500
MA3	>500	<250
MA4	>500	<375
MA5	>500	>500
MA6	>500	>500
MA7	<375	<280
MA8	>500	>500
MA9	<370	<300

La résistance au Manèbe a pu être constatée chez *A. tenuis* syn. *alternata* isolé à partir de fruit de tomate à une concentration élevée et une DL_{95} supérieure à 1300ppm (Chafi, 2005). Singh et Singh (2006) ont rapporté l'efficacité de quelques fongicides testés à savoir, le Chlorothalonil, l'oxychlorure de cuivre, l'azoxystrobine, le propinèbe, l'hydroxyde de cuivre et le mancozèbe à 2500, 2000, 1000, 5000ppm sur *A. alternata* pathogène de la tomate, leurs observations ont révélé qu'à de telles concentrations ces fongicides réduisent d'une manière significative la croissance radiale du champignon. Matharu *et al.* (2006) ont observé que le 2-chloro-benzylidène malono nitrite était efficace contre *A. alternata*. Aussi des complexes de fer à base de Schiff chloro-substitués sont plus efficaces contre *A. alternata* (Hothi *et al.*, 2006).

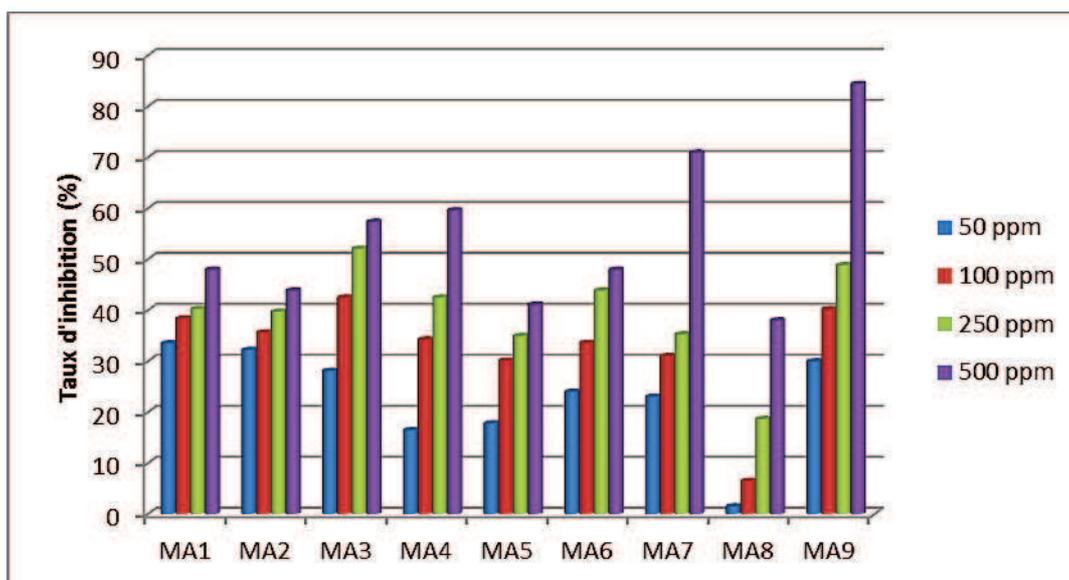


Figure 53: Effet des neuf matières actives sur la croissance mycélienne de la souche A2 incubée six jours à 25°C.

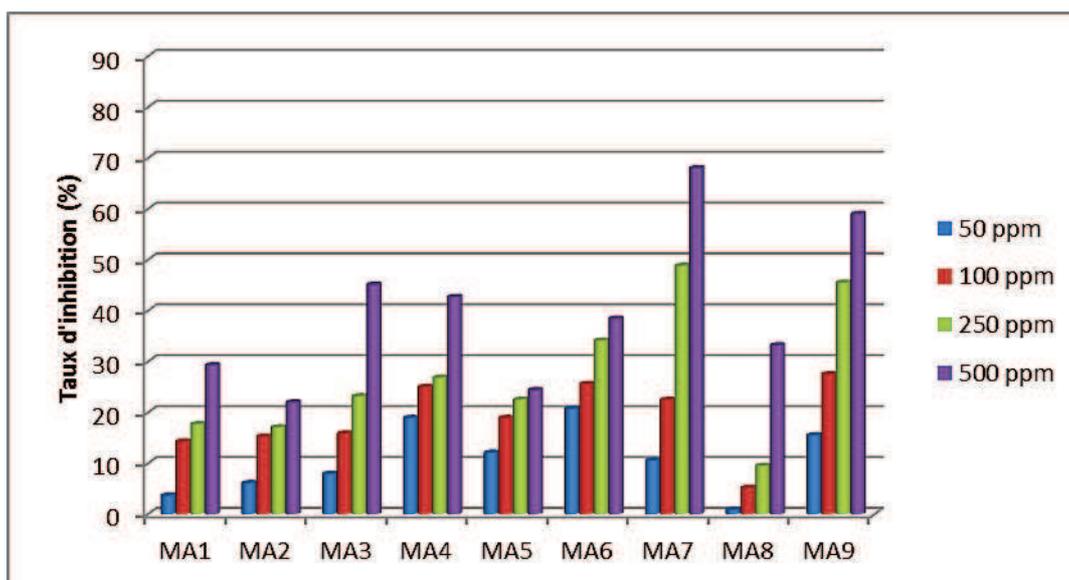


Figure 54: Effet des neuf matières actives sur la croissance mycélienne de la souche A11 incubée six jours à 25°C.

L'effet fongicide des composés dithiocarbamates est justifié principalement au cours de la germination des spores qui résulte de leur interaction avec des groupements amines et hydroxyles d'enzymes intervenant dans le processus de respiration (Eckert, 1988 ; Georgoplus, 1997 ; Tomlin, 2000 ; Lepoivre, 2003 ; Nasraoui, 2006). Nos résultats ont montré que malgré cette action multi-site, ces fongicides sont potentiellement exposés à la résistance. Cette résistance peut être présente naturellement à l'intérieur de la population d'un

champignon ou plus rarement résulter d'une mutation génétique (Gilbert, 1999 ; Bacon, 2003). Ma et Michailides (2004) ont reporté qu'une souche d'*A. alternata* fortement résistante à l'iprodione mais non osmo-sensible a été isolée sur pistache. Il est intéressant de noter que récemment beaucoup de travaux ont étudié les voies de signalisation liées à l'oxydation et la résistance au stress osmotique, la sensibilité aux fongicides, la formation de conidies, et la pathogenèse d'*A. alternata* (Ma et Michailides, 2005 ; Kuang-Ren, 2012). En effet, nos résultats montrent, malgré tout une différence de comportement chez la souche sensible et la souche résistante au stress osmotique, face aux matières actives testées. La souche virulente et résistante aux fongicides est plus faiblement inhibée par le NaCl, ce qui montre que celle-ci a une meilleure capacité d'adaptation par rapport à la souche osmo-sensible qui est faiblement virulente. Des résultats similaires ont été obtenus par Iacomini (2001) sur *A. brassicicola* pathogène des crucifères.

La résistance à un fongicide implique une base génétique qui peut être, soit chromosomique (nucléaire), soit plus rarement extra chromosomique (cytoplasmique). La capacité des *Alternaria* pour maintenir la variabilité génétique élevée leur permet de réagir rapidement à des environnements changeants. Par exemple, une étude a démontré que les isolats d'*A. solani* dans le Midwest des États-Unis sont devenus moins sensibles à un fongicide, ce qui a entraîné des pertes importantes dans les cultures sous serre (Pasche *et al.*, 2004). Selon van der Waals *et al.* (2004), la grande diversité génétique et le degré élevé de flux de gènes au sein des pays pourraient briser la résistance génétique chez l'hôte vis-à-vis *A. solani*. De cette étude, on peut affirmer que certains fongicides de la famille des dithiocarbamates sont moyennement efficaces contre les *Alternaria* à petites spores. Le problème de la résistance fongicide due aux traitements post récolte, et le risque de résidus toxiques des substances entraîne aussi des risques sérieux pour la santé des êtres vivants (homme et animal), cela impose l'adoption d'autres stratégies de lutte plus efficaces et non polluantes pour l'environnement à savoir : variétés résistances, méthodes culturales, microorganismes antagonistes.

Chapitre 4 :
Conclusions générales et Perspectives

1. Etude épidémiologique

Plusieurs espèces du genre *Alternaria*, sont des représentants fréquents de la microflore des fruits et légumes, attaquant principalement les espèces cultivées appartenant au genre *Solanum*. On les rencontre également sur les espèces du genre *Capsicum*, ainsi que sur un grand nombre de *solanacées* spontanées comme *Petunia*, *Schizanthus*, *Salpiglossis* et *Datura*. Sur la base de nos échantillonnages à partir de tissus présentant des symptômes d'alternariose durant les saisons allant de 2011 à 2013, les *Alternaria* à petites et grosses spores sont identifiés comme les principaux agents de la brûlure foliaire des *Solanacées* dans les régions du nord-ouest Algérien qui ont atteint jusqu'à 80% d'incidence dans certaines régions. Cette gravité étant souvent liée à un certain nombre de causes supplémentaires, tels que des programmes de pulvérisation incorrectes (pas d'application préventive et/ou l'utilisation excessive de fongicides), l'irrigation par aspersion, et l'utilisation généralisée de cultivars sensibles.

La mise en œuvre d'un test PCR à partir de tissus infectés nécessite au préalable d'extraire l'ADN de l'échantillon et cette étape doit être particulièrement performante. La méthode d'extraction par une mini préparation après lyse cellulaire au four à microondes s'est avérée rapide, simple et reproductible. Chaque extrait permet d'effectuer une cinquantaine de réactions d'amplification. Ceci constitue un gain de temps très significatif par rapport à la méthode traditionnelle qui nécessite des temps d'incubations d'au moins une semaine et sont généralement influencée par des facteurs physiologiques externes tel que la composition du milieu de base et la température d'incubation. La détection sans ambiguïté des espèces *A. tomatophila*, *A. solani* et les espèces de la section *alternata* présente un intérêt certain pour un suivi épidémiologique et pour envisager des traitements. En effet ces espèces ne présentent pas forcément le même niveau de sensibilité aux fongicide ni le même impact sur les cultures. La méthode que nous avons sélectionnée s'avère adéquate pour les études épidémiologiques et adaptables aux conditions d'analyse de routine. Gannibal *et al.* (2013) ont utilisé la même méthode de détection par PCR de nombreuses espèces du genre *Alternaria* pathogènes des *Solanacées in planta*.

Dans plusieurs Wilaya comme Mostaganem, Mascara et Aïn Témouchent, la pomme de terre et la tomate sont cultivées toute l'année et dans certains cas, dans des domaines contigus (ITCMI, 2010), ces zones peuvent être classées à risques épidémiologiques non négligeable pour l'alternariose. Nos observations sur terrain des plantes malades constituent une étape

importante vers une meilleure compréhension de la dynamique de la maladie dans ces régions. Outre les isolats de la section de *porri* (*A. solani* et *A. tomatophila*) sont considérés comme la cause majeure de la brûlure foliaire des *Solanacées*, qui représentent plus de 50% d'incidence dans certaines régions. Des études ultérieures devront donc étudier la survenue de ces espèces dans tout le territoire Algérien et leur possible incidence avec les isolats de la section *alternata*.

Par conséquent, les agriculteurs doivent compter sur les bonnes pratiques de lutte culturale et un programme de pulvérisation de fongicides afin de gérer adéquatement la maladie. Dans les zones de culture où les pommes de terre et les tomates sont plantées en succession, l'alternariose a le potentiel de devenir une menace sérieuse pour la production de ces légumes, en raison d'une augmentation continue des niveaux d'inoculum par leur accumulation dans le sol et l'infection d'autres cultures. Par conséquent, la plantation des *Solanacées* en monoculture peut créer le risque d'apparition de nouveaux foyers de la maladie dans les années à venir (Treikale *et al.*, 2008). Le danger des infections croisées par l'inoculum aérien vis-à-vis des nouvelles plantations de pommes de terre et de tomate peut être réduit par l'élimination des débris végétaux, la rotation des cultures avec des non-hôtes, ou augmenter l'intervalle de temps de semis entre les cultures successives de tomates et de pommes de terre. Bien que cinq différentes espèces fongiques contribuant à la détérioration des *Solanacées* sont identifiées sur les tissus infectés, celles-ci sont combinées parfois avec des dommages causés par la phytotoxicité des certains fongicides et des symptômes liés à des maladies de carence qui s'avère un problème largement sous-estimé, le cas rencontré dans les trois échantillons (R7, AT3 et AT5) ayant un résultat négatif par test PCR et une dizaine (négatifs) en culture sur milieu nutritif.

2. Isolement et identification des espèces

Plus de 200 souches d'*Alternaria* sont isolées et purifiées à partir de *Solanacées* représentant les symptômes de la brûlure foliaire provenant des différents sites de collecte et 11 souches isolées occasionnellement d'autres familles de plantes maraichères. Des souches appartenant à d'autres genres tels que *Stemphylium*, *Fusarium* et *Bipolaris* sont également isolées et stockées en cultures pures pour une étude comparative.

La classification des *Alternaria* est d'abord fondée sur les caractéristiques morphologiques du thalle et des spores (ainsi que leur agencement). Des niveaux taxonomiques essentiels ont pu être identifiés sur la forme spéciale, le cas d'*A. arborescens* sur la base de la forme

tridimensionnelle de l'agencement des spores. Cette forme spécialisée (*forma specialis*) montre une spécificité parasitaire vis-à-vis à la tomate qui a été décrite par Simmons (2000). D'autres espèces d'*Alternaria* à petites spores sont également identifiées parmi les isolats étudiés dont 39,14% représentant l'espèce *A. tenuissima* et 17,02% l'espèce *A. alternata*. Alors que les isolats à grosses spores parmi lesquels le morphotype *A. tomatophila* représente 31,91% et le morphotype *A. solani* 7,23% ont pu être différenciés sur la base de la taille et la morphologie des spores.

3. Étude physiologique

La diversité des espèces représentatives de l'alternariose des *Solanacées*, notamment celles du groupe *alternata* et du groupe *porri*, a été également mis en évidence à partir de leurs caractères culturaux sur différents milieux de cultures et plusieurs sources de carbone et d'azote testés sur la croissance mycélienne et la sporulation des espèces. De même pour les facteurs physico-chimiques comme la température et le pH, qui nous a permis apprécier leur diversité par une étude statistique comparative. La classification ascendante hiérarchique de ces paramètres n'a fourni aucune corrélation avec la virulence ni avec l'origine géographique des isolats, bien que le dendrogramme obtenu est cohérent avec les espèces de regroupement et a confirmé que les morphotypes identifiés correspondent à des espèces différentes. De même, Morris *et al.* (2000) n'ont pas trouvé de corrélation entre la variabilité génétique et la pathogénicité au sein de la population d'*A. alternata*. Beaucoup de travaux contribuant à séparer certaines espèces d'*Alternaria* selon leur origine à l'aide de marqueurs moléculaires ont donné des résultats variables (Weir *et al.*, 1998 ; Morris *et al.*, 2000 ; Pryor et Michailides, 2002 ; Van Der Walls , 2004 ; Benichou *et al.*, 2011) qui est du à leur propagation notamment dans les échanges commerciaux internationaux. Cependant, aucune preuve concluante jusqu'à présente concernant l'existence de races physiologiques chez les espèces du groupe *porri*. Ceci devrait être étudié en utilisant des lignes de testeur homozygotes et des isolats qui sont aussi homogène que possible.

4. Identification moléculaire

La mise en évidence des espèces *Alternaria* par les méthodes classiques n'est pas toujours évidente particulièrement pour les espèces étroitement liées tels que *A. solani* et *A. tomatophila*. Nous avons d'abord amplifié par PCR les gènes codant pour l'espaseur interne transcrit (ITS) des ADNr de 96 souches après extraction de l'ADN par microonde. Le séquençage de ces régions nous permis d'établir un dendrogramme après une analyse

phylogénique des séquences obtenue et de celles des souches de références, ce qui a permis de distinguer deux grand groupes ; le groupe des espèces de la section *porri* et les espèces de la section *ulocladioides* et le groupe comprenant les espèces de la section *alternata*.

Les produits d'amplifications PCR des gènes codants pour les facteurs d'élongation des isolats du groupe *porri* sont également séquencés. Ainsi, l'alignement des séquences entre elles avec les séquences référencées dans les banques de données moléculaires nous a permis de détecter une différence d'une paire de base entre le morphotype *A. tomatophila* et le morphotype *A. solani*, ce polymorphisme a permis de séparer clairement les deux espèces et de confirmer l'identification phénotypique. De même, l'utilisation des amorces spécifiques OAtF4/ OAtR2 et OAsF7/ OAsR6 nous a permis d'identifier l'ensemble des isolats appartenant à ces deux espèces.

Les amplifiats PCR à partir du couple d'amorces (DeHF/E8T7) spécifique au gène ALt1 codant pour la synthèse de la toxine AAL nous a permis d'identifier les espèces appartenant au pathotype *A. arborescens* ayant un signal identique à celui de la souche de référence CBS102605 utilisée comme témoin positif.

Il serait par contre intéressant d'effectuer des analyses moléculaires approfondies en se basant sur la caractérisation génotypique à fin d'estimer la variabilité intra spécifique au sein des différentes espèces isolées des tomates et de confirmer leur structuration géographique par la méthode AFLP (Amplified fragment Length polymorphisme) ou par amplification de séquences répétées de type microsatellites définis par Benichou *et al.* (2008).

5. Pouvoir pathogène

Diverses expériences sont réalisées pour analyser et confirmer la virulence d'*Alternaria sp.* Les enquêtes à grande échelle sur les lésions des feuilles de tomate et de pomme de terre dans la période de 2011-2013 ont montré que de nombreux symptômes n'ont pas été causées que par *Alternaria solani*, *A. tomatophila* ou encore *A. arborescens*. Comme un grand pourcentage de ces lésions contenait les champignons *A. alternata* et *A. tenuissima* qui sont souvent considérés comme des saprophytes ou opportunistes, la question qui se posait était de savoir si oui ou non ces espèces sont capables de provoquer des nécroses. Dans une étude préliminaire, nous avons réalisé des essais de pathogénicité sur folioles de tomates détachées incubées en chambre de culture afin d'évaluer le taux d'expansion des lésions et la gravité de la maladie causée par les isolats de la section *alternata*. Les résultats ont prouvé que certains

de ces isolats de l'espèce *A. tenuissima* ou de l'espèce *A. alternata*, sont très virulents entraînant un brunissement presque complet des folioles inoculées en une semaine contrairement aux souches faiblement ou non virulentes qui n'étant capable de développer des symptômes que sur folioles blessées et sont donc d'origine physiologique.

Dans les expériences menées sous serre dans lesquels les conditions sont optimisées afin de parvenir à des infections, les symptômes de la maladie sont évalués sur les plantules en calculant le pourcentage de défoliation ainsi que l'aire sous la courbe de la progression de la maladie (AUDPC) pour les différents isolats. Les résultats montrent des différences entre les espèces dans leur réponse à l'infection. Par ailleurs, nous confirmons que certains isolats appartenant à la section *alternata* semblent être capables d'infecter les plantules de tomates et causer des lésions, ce qui suggère la nécessité de traiter ces champignons. D'autre part nous avons montré que les deux variétés de tomate les plus cultivées en Algérie à savoir ; var. Saint Pierre et la Rio Grande sont sensibles à l'alternariose par rapport à la tomate cerise. En ce qui concerne le contrôle d'*Alternaria*, l'accent est mis sur des méthodes de lutte non polluantes pour l'environnement et sans danger pour la santé humaine, tel que l'usage des variétés résistantes aux maladies, les méthodes culturales. Ces méthodes doivent être envisagées en Algérie car elles sont plus économiques et écologiques.

Notre étude confirme aussi que les isolats à grosses spores sont très virulents infligeant des symptômes sévères aux plantules de tomates (var. Saint Pierre) alors que la majorité de ceux de la section *alternata* présentaient des symptômes faibles ou pas après l'inoculation. De ces résultats, il est conclu que les espèces *A. arborescens*, *A. solani* et *A. tomatophila* sont des agents pathogènes très destructeurs causant des dégâts considérables aux cultures de tomates qui sont économiquement importantes. Avec des informations supplémentaires et l'utilisation de techniques de pointe, il devient plus facile de contrôler ce parasite. Des progrès substantiels ont été réalisés dans l'étude de la biosynthèse de métabolites secondaires phytotoxiques et leur rôle dans le développement des maladies des plantes chez différentes espèces d'*Alternaria*. Ce pendant peu d'informations sont fournies sur les toxines secrétés par *A. tomatophila*, il sera donc intéressant d'isoler, d'identifier et de caractériser les toxines secrétées *in vitro* afin d'évaluer leur toxicité. Cela pourra donner des informations supplémentaires sur le niveau d'agressivité et/ou virulence de ces souches.

L'estimation de la virulence de diverses espèces d'*Alternaria* nous a permis de choisir les souches les plus variables au niveau agressivité pour l'étude du complexe pathogène

comprenant les espèces à petites et grosses spores à fin d'élucider l'existence d'interactions synergiques et/ou compétitives. Nous avons ainsi conclu que la gravité de la maladie et l'incidence des espèces à petites spores faiblement ou non virulente dépend de la présence d'autres espèces virulentes, dans la majorité des cas.

Ces études étaient nécessaires pour compléter l'identification des espèces pathogènes des *Solanacées*, ce qui a contribué à élucider des aspects épidémiques de cette maladie. Les résultats obtenus augmentent notre compréhension de l'alternariose en Algérie et aideront dans le développement et l'amélioration des stratégies de contrôle.

6. Lutte chimique

L'étude a porté sur l'estimation de l'osmo-sensibilité des *Aletrnaria* à petites spores (section *alternata*) vis-à-vis aux concentrations 2 et 4% en NaCl nous a permis d'estimer une possible relation avec leur agressivité. A la suite de ces résultats nous avons sélectionné deux souches différentes appartenant à l'espèce *A. alternata* pour les tests fongicides en se basant sur l'hypothèse que chez certains champignons ayant une résistance vis-à-vis certaines familles chimiques est corrélée à une sensibilité osmotique (Fujimura *et al.*, 2000). Les résultats nous ont permis de détecter une résistances chez les deux souches vis-à-vis certaines matières actives mais à différents degrés, cela pourra servir de base pour des tests ultérieurs sur un plus grand nombre d'isolats et sur des fongicides ayants de cibles variées comme les strobulines, les phenylpyrroles, les dicarboximides et les inhibiteurs de la biosynthèse de stérols (IBSs) et ce afin de sélectionner des fongicides plus efficaces.

Bien que les traitements fongicides soient un élément clé dans la gestion intégrée de l'alternariose, l'hypothèse de l'apparition de la résistance ne peut pas être exclue, limitant ainsi l'efficacité et la durée de vie utile des fongicides développés à des coûts toujours plus élevés. Nos résultats ont montré qu'*A. alternata* est sujette à la résistance aux substances de la famille des dithiocarbamates. Par ailleurs, il n'en demeure pas moins, qu'il serait intéressant d'effectuer des analyses moléculaires des symptômes sur feuilles de *Solanacées* par la technique de PCR en temps réel pour la discrimination d'allèle spécifique afin de détecter rapidement des génotypes résistants et de comprendre l'évolution de la résistance aux fongicides au niveau de la population. En outre, une détection rapide des niveaux de résistance dans les populations de champignons phytopathogènes dans un champ serait d'aider

les producteurs à prendre des décisions appropriées sur les programmes de gestion de la résistance pour contrôler les maladies des plantes.

Références Bibliographiques

- Abd-el-Kareem, F.** 2007. Potassium or sodium bicarbonate in combination with Nerol for controlling early blight disease of potato plants under laboratory, greenhouse and field conditions. *Egyptian Journal of Phytopathology*. 35 (1): 73-86.
- Adams, SS. Stevenson, WR.** 1990. Water management, disease development and potato production. *American potato journal*. 67: 3-11.
- Agarwal, K. Kabra, V. Kaushik, P. Sharma, DK.** 2007. Antifungal activity of novel organo thiophosphonates. *Annals of Plant Protection Sciences*. 15 (2): 441-444.
- Agnes, A.** 2005. Distribution and characterization of sweet potato *Alternaria* blight isolates in Uganda. Thesis. Master of Science in crop science. Makerere University. 20.
- Agnihotri, VP.** 1964. Studies on Aspergilli. XVI. Effect of pH, Temperature and Carbon and Nitrogen Interaction. *Mycopath. Mycol. Appl.* 24: 305-314.
- Agrios, GN.** 2005. *Plant pathology*. 5th Ed. Elsevier, London. 922: 455
- Amsellem, Z. Zidack, NK. Quimby, PC. Gressel, JrJ.** 1999. Long-term dry preservation of viable mycelia of two mycoherbicidal organisms. *Crop prot.* 18: 643-649.
- Anand, T.** 2002. Studies on fruit rot of chilli (*Capsicum annuum* L.) caused by *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler and Bisby and *Alternaria alternata* (Fr) Keissler. M.Sc. (Ag.) thesis, Tamil Nadu Agric. Univ. Coimbatore, India. 157 pp.
- Anastasia, L. Lagopodi, Thanassouloupoulos, CC.** 1998. Effect of a leaf spot disease caused by *Alternaria alternata* on yield of sunflower in Greece. *J. Plant Dis.* 82: 41-44.
- Andersen, A. Thrane, U.** 1996. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolites profiles and cultural characteristics. *Can. J. Microbiol.* 42: 685-689.
- Andersen, B. Dongo, A. Pryor, BM.** 2008. Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A porri*, *A solani*, and *A. tomatophila*. *Mycological Research*. 2 (2): 241-250.
- Andersen, B. Frisvad, JC.** 2004. Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *J. Agricul. Food Chem.* 52: 7507-7513.
- Andersen, B. Hansen, ME. Smedsgaard, J.** 2005. Automated and Unbiased Image Analyses as Tools in Phenotypic Classification of Small-Spored *Alternaria* spp. *Phytopathology*. 95 (9): 1022-1029.
- Andrew, M. Peever, T L. Pryor, BM.** 2009. An expanded multilocus phylogeny does not resolve species within the small-spored *Alternaria* species complex. *Mycologia*. 101:95-109.
- Anginyah, TJ. Narla, R.R. Carey, EE. Njeru, R.** 2001. Etiology, effect of soil pH and Sweetpotato varietal reaction to *Alternaria* Leaf petiole and stem blight in Kenya. *African Crop Science Journal*. 9 (1): 287-282.
- Anonyme.** 2010. Institut national de la protection des végétaux (INPV) – Algérie.

- Aradhya, MK. Chan, HM. Parfitt, DE.** 2001. Genetic variability in the pistachio late blight fungus *Alternaria alternata*. Mycol. Res. 105: 300-306.
- Arisan – Atac, IHE. Kubicek, CP.** 1995. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma sp.* capable of chesnut blight biocontrol. F E M S Microbiol. Lett. 126: 249-256.
- Arrebola, E. Jacobs, R. Korsten, L.** 2010. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB against postharvest fungal pathogens. J Appl Microbiol. 108: 386-395.
- Arunkumara, KT.** 2006. Studies on *Alternaria solani* (Ellis and Martin) Jones and Grout causing early blight of tomato. Master of Science in plant pathology. Thesis submitted to the University of Agricultural Sciences. Dharwad. 69pp.
- Attfield, PV.** 1997. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. Nat Biotechnol. 15: 1351-1357.
- Attrassi, K. Benkirane, R. Attrassi, B. Badoc, A. Douira, A.** 2007. Effet de la source de carbone et d'azote sur la croissance de moisissures des pommes de conservation. Bull. Soc. Bordeaux. 211-224.
- Attrassi, K. Benkirane, R. Attrassi, B. Badoc, A. Douira, A.** 2007. Efficacité de deux fongicides benzimidazolés et de l'anilinopyrimidine sur la pourriture des pommes de conservation. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 146 : 195-210
- Avenot, H.** 2003. Variabilité au sein de l'espèce fongique phytopathogène *Alternaria brassicicola*. Analyse au niveau d'un marqueur sélectionné de type résistance aux fongicides et de marqueurs neutres de type microsatellites. Thèse de Doctorat. Université d'Angers. 140pp.
- Babu, S. Seetharaman, K. Nandakumar, R. Johanson, I.** 2001. Variation in sensitivity to fungicides among isolates of *Alternaria solani* causing tomato leaf blight disease. Acta phytopathologica et Entomologica Hungarica. 36: 251-258.
- Bacon, R.** 2002. Gestion de la résistance aux fongicides. Agriculture et Agroalimentaire Canada. <http://www.agrireseau.qc.ca/petitsfruits/Documents/resistance%20aux%20fungicides.PDF>.
- Badillet, G.** 1991. Les Alternarioses cutanées. Revue générale. J. Mycol. Méd. 118: 59-71.
- Bahnweg, G. Schulze, S. Möller, EM. Rosenbrock, H. Langebartels, C. Sander mann, H.** 1998. DNA isolation from recalcitrant materials such as tree roots, bark and forest soil for the detection of fungal pathogens by polymerase chain reaction. Anal Biochem. 262: 79-82.
- Baker, KE. Cook, RJ.** 1974. Biological control of plant pathogens, Freeman, San Fransisco.
- Banerjee, MK. Chhabra, ML. Saini, PS.** 1998. Responses of tomato cultivars to *Alternaria* blight. Tests Agrochem Cultiv. 19: 50-51.
- Barkai-Golan, R.** 2008. *Alternaria* mycotoxins. In: Mycotoxins in fruits and vegetables. Eds

- Barkai-Golan R and Nachman P. Academic Press, San Diego, CA, USA. 185-203.
- Barksdale, TH. Stoner, AK.** 1977. A study of the inheritance of tomato early blight. *Plant Dis. Rep.* 61: 63-65.
- Barksdale, TH.** 1969. Resistance of tomato seedlings to early blight. *Phytopathology.* 59:443-446.
- Barrat, RW. Richards, MC.** 1944. Physiological maturity in relation to *Alternaria* blight in tomato. *Phytopathology.* 34: 997.
- Bartlett, DW. Clough, J M. Godwin, JR. Hall, AA. Hamer, M. Parr- Dobrzanski, B.** 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58:649-662.
- Bashan, Y. Levanony, H. and Or, R.** 1991. Association between *Alternaria macrospora* and *Alternaria alternata*, causal agents of cotton leaf blight. *Can. J. Bot.* 69: 2603-2607.
- Basu, PK.** 1974. Measuring early blight, its progress and influence on fruit losses in nine tomato cultivars. *Can Plant Dis Surv.* 54: 45- 51.
- Benada, M.** 2010. Etude de la variabilité phénotypique du champignon *Alternaria dauci* pathogène des *Apiacées* en vue d'améliorer les méthodes de lutte. Mémoire de Magister en Microbiologie. Université d'Oran Es-Sénia. 96pp.
- Benaïssa, R. Abdelmalek, S. Benbada.** 2009. Le trait d'union des opérateurs économiques pour le Renouveau du Monde Agricole et Rural. *Fillaha.* 3: 1111- 4762.
- Benchamou, N. Chet, I.** 1993. Hypha interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasite process. *Phytopathology.* 83: 1062- 1071.
- Benichou, S. Dongo, A. Henni, DE. Peltier, P. Simoneau, P.** 2009. Isolation and characterization of microsatellite markers from the phytopathogenic fungus *Alternaria dauci*. *Molecular Ecology Resources.* 9: 390-392.
- Benichou, SL.** 2011. Etude de la variabilité génétique et phénotypique du champignon *Alternaria dauci* pathogène des *Apiacées* en vue d'améliorer les méthodes de lutte. Thèse de doctorat en Microbiologie. Université d'Oran Es Sénia. 135pp.
- Berto, P. Belingheri, L. Dehoeter, B.** 1997. Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria brassicicola*. *Biotechnology Letters.* 19 (6): 533- 536.
- Berto, P. Commenil, P. Belingheri, L. Dehoeter, B.** 1999. Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in infection of cauliflower leaves. *LEMS Microbiology letters.* 180: 183-189.
- Bhandari, JKS. Singh, RS.** 1976. Effect of carbon and nitrogen sources on the growth of *Alternaria triticina*. *Indian Phytopathology.* 29: 88- 89.

- Bilgrami, KS. Verma, RN.** 1978. Physiology of fungi. Vikas Publishing House, New Delhi, 597pp.
- Bisby, GR.** 1939. *Trichoderma viride* Pers. Ex. Fries and notes on Hypocrea, Trans. Br. Mycol. Soc. 33: 149- 169.
- Blancard, D. Laterrot, H. Marchoux, G. Candresse, T.** 2012. A colour Handbook - Tomato Diseases: identification, biology and control. Manson Publishing Ltd. 688 pp.
- Bock, CH. Poole, GH. Parker, PE. Gottwald, TR.** 2010. Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. Crit. Rev. Plant. Sci. 29: 59-107.
- Boedo, C. Benichou, S. Berruyer, R. Bersihand, S. Dongo, A. Simoneau, P. Lecomte, M. Briard, M. Le Clerc, MV. Poupard, P.** 2012. Evaluating aggressiveness and host range of *Alternaria dauci* in a controlled environment. Plant Pathology. 61: 63-75.
- Boedo, C. Clerc, CL. Briard, M. Simoneau, P. Chevalier, M. Georgeault, S. Poupard, P.** 2008. Impact of carrot resistance on development of the *Alternaria* leaf blight pathogen (*Alternaria dauci*). Eur. J. Plant Pathol. 121: 55-66.
- Botta, A. Viala, A.** 2005. Toxicologie. Lavoisier 2eme édition. Paris. 261:1994 pp.
- Bottalico, A. Logrieco, A.** 1998. Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. In: Sinha, K.K. and Bhatnagar, D. (Eds.) Mycotoxins in agriculture and food safety. Marcel Dekker, Inc, New York, USA. 65-108 pp.
- Botton, B. Bretton, A. Fevre, M. Gauthier, S. Guy, Ph. Larpent, JP. Reymond, P. Sanglier, JJ. Vayssier, Y. Veau, P.** 1990. Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. 2eme edition. Paris. 512: 309.
- Brame, C, Flood, J.** 1983. Antagonism of *Aureobasidium pullulans* towards *Alternaria solani*. Transactions of the British Mycological Society. 81 (3): 621-624.
- Brancato, FP. Golding, NS.** 1953. The diameter of the mold colony as a reliable measure of growth. Mycologia. 45: 848-864.
- Brouwer, M. Lievens, B. van Hemelrijk, W. van den Ackerveken, G. Cammue, BPA. Thomma, BPHJ.** 2003. Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR. FEMS Microbiol. Lett. 228: 241-248.
- Brzonkalik, K. Herrling, T. Syldatk, C. Neumann, A.** 2011. The influence of different nitrogen and carbon sources on mycotoxin production in *Alternaria alternata*. International J. Food Microbiol. 147: 120-126.
- Bulajić, A. Djekić, I. Lakić, N. and Krstić, B.** 2009. The presence of *Alternaria spp.* on the seed of *Apiaceae* plants and their influence on the seed emergence. Arch. Biol. Sci., Belgrade. 61 (4): 871-881.

- Bush, RK. Portnoy JM.** 2001. The role and abundance of fungal allergens in allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107: 430- 440.
- Carbone, I. Kohn, LM.** 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia.* 91: 553-556.
- Carlos, M. Ochoa.** 1991. The potatoes of South America. Cambridge University Press. (0521380243 ISBN)182pp.
- Cassol, T St. Clair, DA.** 1994. Inheritance of resistance to black mold (*Alternaria alternata* (Fr. Keissler) in two interspecific crosses of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. *cheesmaniif. typicum*), *Theor. Appl. Genet.* 88: 581-88.
- Chaerani, R. Voorrips, RE.** 2006. Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance (review). *J Gen Plant Pathol.* 72: 335-347.
- Chafi, K.** 2005. Etude physiologique et évaluation in vitro de l'efficacité de certains fongicides sur *Alternaria*. Mémoire de Magister. Université Es-Sénia d'Oran. 95 pp.
- Chalutz, E. Ben-Arie, R. Droby, S. Cohen, L. Weiss, B. Wilson, CL.** 1988. Yeasts as biocontrol agents of postharvest diseases of fruit. *Phytoparasitica.* 16: 69- 75.
- Chattopadhyay, SK. Nandi, B.** 1982. Inhibition of *Helminthosporium oryza* and *Alternaria solani* by *Streptomyces longisporius* (Krasil nikov) Waksman. *Journal of Plant and Soil.* (69):171-175.
- Chaturvedi, C.** 1966. Utilization of oligosaccharides by three imperfect fungi. *Mycopathology Etmycological Application.* 29: 323-330.
- Chelkowski, J. Visconti, A.** 1992. *Alternaria*. Biology, plant diseases and metabolites. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands. 573 pp.
- Chou, HH. Wu, WH.** 2002. Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycol. Res.* 106 (2): 164-169.
- Choudhary, DK. Johri, BN.** 2009. Interactions on *Bacillus spp.* and plants- with special reference to induced systemic resistance in plant. *Microbiol Res.* 164: 493- 513.
- Choulwar, AB. Datar, VV. Kurundkar, BD.** 1989. Efficacy of fungitoxicants on the mycelial growth of *A. solani*. *Pestology.* 13: 17-19.
- Christ, B J.** 1991. Effect of disease assessment method on ranking potato cultivars for resistance to early blight. *Plant Disease.* 75: 353-356.
- Cooke, DEL. Forster, JW. Jenkins, PD. Jones, DG. Lewis, DM.** 1998. Analysis of intraspecific and interspecific variation in the genus *Alternaria* by the use of RAPD-PCR. *Annals of Applied Biology.* 132: 197-209.
- Coombe, RG. Jacobs, JJ. Watson, TR.** 1970. Metabolites of some *Alternaria* species. The

- structures of altenusin and dehydroaltenusin. *Australian Journal of Chemistry*. 23: 2343-2351.
- Corbiere, R. Rekad, F. Galfout, A. Andrivon, D. Bouznad, Z.** 2010. Phenotypic and genotypic characteristics of Algerian isolates of *Phytophthora infestans*. Twelfth EuroBlight workshop. PPO-Special Report no. 14: 133- 146.
- Cramer, RA. Lawrence, CB.** 2003. Cloning of a gene encoding an *Alt a 1* isoallergen differentially expressed by the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2361-2364.
- D'Amato, G. Spieksma, FThM.** 1995. Aerobiologic and clinical aspects of mold allergy in Europe. *Allergy*. 50: 870-877.
- Datar, VV. Mayee, CD.** 1981, Assessment of loss in tomato yield due to early blight. *Indian Phytopathology*. 34: 191-195.
- Datar, VV.** 1996. Efficacy of growth regulators and fungitoxicants on fruit rot of chilli. *Ind. J. Mycol. Pl. Pathol.* 26: 239-242.
- Davicino, R. Mattar, MA. Casali, YA. Graciela, S. Margarita, E. Micalizzi, B.** 2007. Antifungal activity of plant extracts used in folk medicine in Argentina. *Revista Peruana de Biología*. 14: 247-251.
- Davis, ND. Diener, UL. Morgan-Jones, G.** 1977. Tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* and *Alternaria tenuissima* isolated from cotton. *Applied and Environmental Microbiology*. 34: 155-157.
- Dereeper, A. Guignon, V. Blanc, G. Audic, S. Buffet, S. Chevenet, F. Dufayard, JF. Guindon, S. Lefort, V. Lescot, M. Claverie, JM. Gascuel, O.** 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist Nucleic Acids Research. (Web Server Issue):W465-9. Epub 2008 Apr 19.
- Deshwal, K.** 2004. Taxonomy and parasitism of *Alternaria* species associated with *Solanaceous* hosts. M.Sc. (Ag.) Thesis, C.S.A. Univ. Agric. & Technol. Kanpur.
- Dhingra, OD. Sinclair, JB.** 1995. *Basic Plant Pathology Methods*, second ed. CRC Lewis, Boca Raton, FL.
- Dellavalle, D P. Cabrera, A. Alem, D. Larrañaga, P. Ferreira, FM. Rizza, D.** 2011. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 71 (2): 231- 239.
- Digby, PGN. Kempton, RA.** 1987. *Multivariate analysis of ecological communities*. Chapman and Hall, London. 131-147.
- Dillard, HR. Clobb, AC. Lambay, JS.** 1998. Transmission of *Alternaria brassicicola* to cabbage by flea beetles (*Phyllotreta crucifera*). *Plant Dis.* 82: 153-157.

- Dini-Andreote, F. Pietrobon, VC. Dini Andreote, F. Silva Romão, A. Bellato Spósito, BM. Luiz Araújo, W.** 2009. Genetic variability of Brazilian isolates of *Alternaria alternata* detected by AFLP and RAPD techniques. *Braz J Microbiol.* 40 (3): 670- 677.
- Domsch, KH. Gams, W. Anderson, TH.** 1980. Compendium of soil fungi. Vol. II. Academic Press, London, UK, 405 pp.
- Dongyou, L.** 2010. Molecular Detection of Foodborne Pathogens. CRC Press Taylor and Francis group. USA. 524- 905.
- Droby, S. Prusky, D. Dinoor, A. Barkai-Golan, R.** 1984. *Alternaria alternata*: A new pathogen on stored potatoes. *Plant Dis.* 86: 160-161.
- Duhan, JC. Suhag, KS.** 1990. *Alternaria* leaf and pod blight of cauliflower. *Indian Phytopathol.* 43: 231-234.
- Dutkiewicz, J.** 1997. Bacteria and fungi in organic dust as potential health hazard. *Ann. Agric. Environ. Med.* 4: 11-16.
- Eckert, JW.** 1988. Historical development of fungicide resistance in North in plant pathogens. In: Fungicide Resistance inputs America. (C.J. Delp ed.), American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA. 1-3.
- Edin, E.** 2012. Species specific primers for identification of *Alternaria solani*, in combination with analysis of the F129L substitution associates with loss of sensitivity toward strobilurins. *Crop Prot.* 38: 72-73.
- Egusa, M. Ozawa, M. Takabayashi, J. Otani, H. Kodama, M.** 2009. The jasmonate signaling pathway in tomato regulates susceptibility to a toxin-dependant necrotrophic pathogen. *Planta.* 229: 965- 976.
- El-Farnawany, MA.** 2006. Effect of seed treatment with *Trichoderma harzianum* on reducing tomato early blight incidence. *Assiut-Journal-of-Agricultural-Sciences.* 37 (1): 201-216.
- Elliott, JA.** 1917. Taxonomic characters of the genera *Alternaria* and *Macrosporium*. *Amer. J. of Bot.* 4: 439- 476.
- Ellis MB, Gibson, IAS.** 1975. *Alternaria solani* no. 45 set 48. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK.
- Ellis, M. B.** 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Kew. 608pp.
- Emeryk, A. Chojna, A. Bartkowiec, k. Emeryk, M. Postępski, J.** 2004. Prevalance of asthma and some respiratory symptoms in the years 1995 and 2001 in schoolchildren from rural regions of Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 11: 63- 66.
- Erikson, O E. Hawksworth, DJ.** 1991. Outline of the ascomycetes. *Syst. Ascomycet.* 9: 39- 271.
- Esquivel, EA.** 1984. *Pleospora solani* sp. nov, teleomorphosis of *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout. *Phytopathology.* 74:1014.

- Evans, KJ. Nyquist, WE. Latin, RX.** 1992. A model based on temperature and leaf wetness duration for establishment of *Alternaria* leaf blight of muskmelon. *Phytopathology*. 82: 890-895.
- Fahim, M M.** 1966. The effect of light and other factor in the sporulation of *Alternaria porri*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 49 (1): 73-78.
- Fazal, A. Khan, MJ. Sexena, SK.** 1994. The incidence of *Alternaria spp.* in different cultivars of cabbage and cauliflower seeds. *Indian Phytopathol.* 47: 419- 421.
- Fencelli, MI. Kimati, H.** 1990. Influence of culture media and fluorescent light on the sporulation of *Alternaria dauci*. *Phytopathologica*. 16: 248- 252.
- Fontem, D. A.** 2003. Quantitative Effects of Early and Late Blights on Tomato Yields in Cameroon. *Tropicultura*. 21 (1): 36-41.
- Fontem, DA.** 1993. Survey of tomato diseases in Cameroon. *Tropicultura*. 11 (3): 87-90.
- Foolad, MR. Ntahimpera, N.** 2000. Comparison of Field, Greenhouse, and Detached-Leaflet Evaluations of Tomato Germ Plasm for Early Blight Resistance. *Plant Disease*. 84 (9): 67-972.
- Foolad, MR. Lin, GY.** 2001. Heritability of early blight resistance in a *Lycopersicon esculentum* × *Lycopersicon hirsutum* cross estimated by correlation between parent and progeny. *Plant Breed.* 120: 173- 177.
- Foolad, MR. Ntahimpera, N. Christ, BJ. Lin, GY.** 2000. Comparison of field, greenhouse, and detached-leaflet evaluations of tomato germ plasm for early blight resistance. *Plant Dis.* 84: 967-972.
- Foolad, MR. Subbiah, P. Ghangas, GS.** 2002. Parent–offspring correlation estimate of heritability for early blight resistance in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Euphytica*. 126: 291-297.
- Fraser, JT.** 2002. Two species of *Alternaria* cause early blight of potato (*Solanum tuberosum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*). Thesis. Master of Science. Cornell University. 72pp.
- Fraser, JT. Zitter, TA.** 2003. Two species of *Alternaria* cause early blight of potato (*Solanum tuberosum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*). *phytopathology*. 93pp.
- Freeman, GG.** 1965. Isolation of alternariol and alternariol monomethyl ether from *Alternaria dauci* (Kukn) Groves and Skolko. *Phytochemistry* .5: 719-721.
- Fries, E M.** 1832. *Systema mycologicum*.. E. Moritz, Greifswald. Vol. 3: 261- 524
- Frisvad, JC. Bridge, PD. Arora, DK.** 1998. *Chemical fungal taxonomy*. New York: Marcel Dekker.

- Fujimura, M. Ochiai, N. Ichiishi, A. Usami, R. Yamaguchi, I.** 2000. Sensitivity to phenylpyrrole fungicides and abnormal glycerol accumulation in os and cut mutant strains of *Neurospora crassa*.) J Pestic Sci (Nihon Noyaku Gakkai shi. 25: 31-36.
- Gachon, C. Saindrenan, P.** 2004. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. Plant Physiol. Biochem. 42: 367-371.
- Ganie, SA. Ghani, MY. Nissar, Q. Jabeen, N. Anjum, Q. Ahanger, Ayaz, AF.** 2013. Status and symptomatology of early blight (*Alternaria solani*) of potato (*Solanum tuberosum* L.) in Kashmir valley. African Journal of Agricultural Research. 8 (41): 5104-5115.
- Gannibal, PB. Orina, AS.** 2013. Characterization of a tomato pathogen, *Alternaria tomatophila*, previously unidentified in Russia. Mikologiya I Fitopatologiya .47: 51-55.
- Gannibal, PB. Orina. AS. Mironenko, NV. Levitin, MM.** 2014. Differentiation of the closely related species, *Alternaria solani* and *A. tomatophila*, by molecular and morphological features and aggressiveness. European Journal of Plant Pathology. European Journal of Plant Pathology. 139 (3): 609-623.
- Gardes, M. Bruns, TD.** 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of Mycorrhizae and rusts. Molecular ecology. 2: 113- 118.
- Gardes, M. White, TJ. Fortin, JA. Bruns, TD. Taylor, TJ.** 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial DNA. Canadian Journal of Botany. 69: 180- 190.
- Gardner, RG.** 1988. NC EBR-1 and NC EBR-2 early blight resistant tomato breeding lines. HortScience. 23: 779-781
- Gardner, RG.** 2000. “Plum Dandy”, a hybrid tomato, and its parents, NC EBR-5 and NC EBR-6. HortScience. 35: 962- 963
- Gardner, RG. Shoemaker, PB.** 1999. “Mountain Supreme” early blight resistant hybrid tomato and its parents, NC EBR-3 and NC EBR-4. HortScience. 34: 745-746.
- Garibaldi, A. Gilardi, G. Gullino, ML.** 2007. First report of *Alternaria* leaf spot on Camellia in Italy. Plant Disease. 91 (3): 324.
- Gemwat, PD. Ghosh, SK.** 1980. Studies on the physiology of growth of *Alternaria solani*. Indian Journal of Mycology Plant Pathology. 9: 138-139.
- Georgoplus, SG.** 1997. Pathogens become resistant to chemicals. In: Plant Disease I. (J.G. Horsfall and E.C. Cowling ed.), Academic Press, New York, NY. USA. 327- 345.
- Ghosh, PP. Mandal, D. Laha, S. Dasgupta, MK.** 2009. Dynamics and survey model in managing fungal disease. J. Plant Protect. Sci. 1:55-59.
- Gilbert, G.** 1999. La résistance des champignons aux fongicides. Ministère de l’agriculture et des pêcheries et de l’alimentation .Québec.

- Gomez-Rodriguez O, Zavaleta-Mejia E, Livera-Munoz M González-Hernández, V. Cardenas-Soriano, E.** 2007. Physiological and morphological adaptation in tomato intercropped with *Tagetes erecta* and *Amaranthus hypochondriacus*. *Rev. Fitotec. Mex.* 30 (4): 421-428.
- Gomez-Rodriguez, O. Zavaleta-Mejia, E. Livera-Munoz, M. Cardenas-Soriano, E.** 2003. Allelopathy and microclimatic modification of intercropping with marigold on tomato early blight disease development. *Field Crops Res.* 83 (1): 27-34.
- Goodwin, DC. Lee, SB.** 1993. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques.* 15: 438- 444.
- Goyal, KN.** 1977. Effect of pH, carbon and nitrogen nutrition on the growth of *Alternaria tenuis*. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology.* 7: 155-157.
- Gravesen, S. Frisvad, JC. Samson, RA.** 1994. *Microfungi.* High Tech PrePres A/S, Copenhagen, Denmark. 168 pp.
- Grigolli, JFJ. Kubota, MM. Alves, DP. Rodrigues, GB. Cardoso, CR. Henriques da Silva, DJ. Mizubuti, ESG.** 2011. Characterization of tomato accessions for resistance to early blight. *Crop Breed Appl. Biotechnol.* 11: 174-180.
- Grogan, RG. Kimble, KA. Misaghi, I.** 1975. A stem canker disease of tomato caused by *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*. *Phytopathology.* 65: 880-886.
- Guarro, J. Gené, J. Stchigel, AM.** 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (3): 454-500.
- Guillemette, T. Iacomi-Vasilescu, B. Simoneau, P.** 2004. Conventional and real-time PCR based assay for detecting pathogenic *Alternaria brassicae* in cruciferous seed. *Plant Dis.* 88: 490-496.
- Guiraud, JP.** 2003. *Microbiologie alimentaire.* Ed Dunod. Paris. 65: 331.
- Gupta, YK. Gupta, MN. Seth, AK.** 1979. Effect of different carbon compounds on the growth and sporulation of *Alternaria alternata* (FR) Keiseler, causing leaf blight of sun flower. *Plant pathology.* 190- 192.
- Gwary, DM. Nahunnaro, H.** 1998. Epiphytotics of early blight of tomatoes in Northeastern Nigeria. *Crop Protection.* 17: 619- 624.
- Hall, TA.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 41: 95-98.
- Harrison, MD. Livingston, CH. Oshima, N.** 1965. Epidemiology of potato early blight in Colorado: 1. Initial infection, disease development and the influence of the environmental factors. *Amri. Pot. J.* 42: 279-291.
- Hartill, WFT.** 1968. Brown spot of tobacco. *World Crops.* 20: 54-59.

- Hasija, SK.** 1970. Physiological studies of *Alternaria citri* and *A. tenuis*. *Mycologia*. 62: 289-295.
- Hathout, TA.** 1997. Causes of blackening of infected spots of tomato fruits. *Egyptian Journal of Physiological Sciences*. 17 (2): 351-360.
- Hatzipapas, P. Kalosaka, K. Dara, A. Christias, C.** 2002. Spore germination and appressorium formation in the entomophagic *Alternaria alternata*. *Mycological research*. 106: 1349-1359.
- Hawkes, JG.** 1990. *The potato: evolution, biodiversity and genetic resources.*, Londres, Belhaven Press. 259pp.
- Hawkes, JG.** 1994. *Potato genetics. International, Wallingford, Origins of cultivated potatoes and species relationships.* (Eds. Bradshaw, J.E and Mackay, G.R.). CAB.
- Henni, JE.** 1987. Evaluation de l'efficacité de certains champignons antagonistes vis-à-vis de *Verticillium dahliae*. *Crypt. Mycol.* P: 203- 207.
- Hibbett, DS.** 2006. A phylogenetic overview of the Agaricomycotina. *Mycologia*. 98 (6): 917-925.
- Hilal, AA. Kamel, BKM.** 1990. *Alternaria* blight and rust diseases of carnation and their control. *Agric. Res. Rev.* 68: 543- 554.
- Hocking, AD. Miscamble, BF. Pitt, JI.** 1994. Water relations of *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Curvularia lunata* and *Curvularia pallescens*. *Mycological Research*. 98: 91-94.
- Hooker, WJ.** 1981. *Compendium of Potato Diseases.* The American Phytopathological Society. St. Paul. MN. 125pp.
- Horsfall, JG. Barrat, RW.** 1945. An improved grading system for measuring plant diseases. *Phytopathology*. 35: 655.
- Hothi, HS. Duga, D. Sharma, JR. Manrao, MR.** 2006. Synthesis and fungitoxicity of Fe (III) complexes of chloro substituted Schiff bases. *Pesticide Res. J.* 18 (2): 116-118.
- Hradil, CM. Hallock, IF. Clardy, J. Kenfield, DS. Strobek, G.** 1989. Phytotoxins of *Alternaria cassiae*. *Phytochemistry*. 28: 73-75.
- Hubballi, M. Nakkeeran, S. Raguchander, T. Anand, T. Samiyappan, R.** 2010. Effect of Environmental Conditions on Growth of *Alternaria alternata* Causing Leaf Blight of Noni. *World Journal of Agricultural Sciences*. 6: 171-177.
- Hubballi, M. Sornakili, A. Anand, SNT. Raguchander, T.** 2011. Virulence of *Alternaria alternata* infecting noni associated with production of cell wall degrading enzymes. *Journal of Plant Protection research*. 51: 1.
- Iacomi-Vasilescu, B.** 2001. Les champignons du genre *Alternaria* pathogènes des crucifères et transmis par les semences: identification moléculaire et analyse de la variabilité génétique. Thèse de Doctorat. Université d'Angers. 167pp.

- Ikhou, AM.** 2011. Isolement, identification et caractérisation de quelques agents microbiens responsables de la détérioration superficielle des fruits de tomate. Mémoire de Master en Microbiologie. Université d'Oran Es Sénia. 62pp.
- Isshiki, A. Akimitsu, K. Yamamoto, M. Yamamoto, H.** 2001. Endopolygalacturonase in essential for citrus Black Rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. The American Phytopathological society. 14: 749-757.
- ITCMI.** 2010. Fiche techniques valorisée des cultures maraîchères et Industrielles : La culture de pomme de Terre. : Institut Technique Des Cultures Maraichères et Industrielles. Staoueli – Alger.
- ITCMI.** 2010. Fiche techniques valorisée des cultures maraîchères et Industrielles : La culture de tomate. : Institut Technique Des Cultures Maraichères et Industrielles. Staoueli – Alger.
- Ivanovic, M. Mijatovic, M. Antonijevic, D.** 2002. Effect of sodium bicarbonate on *Alternaria solani* in tomato. Acta Horticulturae. 535-539
- James, WC.** 1974. Assessment of plant disease and losses. Ann. Rev. Phytopathol. 12: 27-48.
- Janardhanan, KK. Husein, A.** 1975. Isolation of tenuazonic acid, a phytotoxin from *Alternaria alternata* causing leaf blight of *Datura innoxia* Mill. Indian Journal of Experimental Biology. 13: 321-322.
- Jia, C. Zhang, L. Liu, L. Wang, J. Li, C. Wang, Q.** 2012. Multiple phytohormone signalling pathways modulate susceptibility of tomato plants to *Alternaria alternata f. sp. lycopersici*. J Exp Bot. 64 (2): 637-50.
- Jiang, YM. Chen, F. Liu, SX.** 1997. A preliminary study on the biological control of litchi fruit. Journal of fruit scienc. 14 (3): 185-186.
- Jiang, YM. Zhu, XR. Li, YB.** 2001. Postharvest control of litchi fruit rot by *Bacillus subtilis*. Lebensmittel Wissenschaft Technology. 34 (7): 430- 436.
- Johnson, J. W.** 1923. Relationships between hydrogen, hydroxyl-ion and salt concentration and the growth of seven soil molds. Iowa Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 76: 308-342.
- Johnson, RD. Johnson, L. Itoh, Y. Kodama, M. Otani, H. Kohmoto, K.** 2000. Cloning and characterization of a cyclic peptide synthetase gene from *Alternaria alternata* apple pathotype whose product is involved in AM-toxin synthesis and pathogenicity. Molecular Plant-Microbe Interactions. 13 (7): 742-753.
- Joly, P.** 1964. Le genre *Alternaria*. Encyclopédie Mycologique, Ed. J. P. Lechevalier. Paris. 250pp.
- Jourdan, E. Henry, G. Duby, F. Dommès, J. Barthelemy, LP. Thonart, P. Ongena, M.** 2009. Insights into the defense- related events occurring in plants cells following perception of surfactin- type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. Mol Plant Microbe interact. 22: 456- 468.

- Kamal, S. Rajkumar, RM. Singh, RV.** 2007. Field efficacy of bioagents and fungicides against tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) diseases. *Environment and Ecology*. 25: 921-924.
- Kameda, K. Aoki, H. Tanaka, H. Namiki, M.** 1973. Studies on metabolites of *Alternaria kikuchiana* Tanaka, a phytopathogenic fungus of Japanese pear. *Agricultural and Biological Chemistry*. 37: 2137-2146.
- Kano, ROK. Nakamura, Y. Ooka, S. Kashima, M. Mizoguchi, M. Watanabe, S. Hasegawa, A.** 2000. Differences among chitine synthase I gene sequences in *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. *Med. Mycol.* 38: 47-50.
- Keissler, K. von.** 1912. Zur Kenntnis der Pilzflora Krains. *Beih. Bot. Centralbl.* 29: 395- 440.
- Khalaf, M Alhussaen.** 2012. Morphological and Physiological characterization of *Alternaria solani* isolates of tomato in Jordan valley. *Research Journal of Biological Sciences*. 7 (8): 316- 319.
- Kim, YK. Xiao, CL. Rogers, JD.** 2005. Influence of culture media and environmental factors on mycelia growth and pycnidial production of *Sphaeropsispyripitrescens*. *Mycologia*. 97: 25-32.
- Kinoshita, T. Renbutsu, Y. Khan, I. Kohmoto, K. Nishimura, S.** 1972. Distribution of tenuazonic acid production in the genus *Alternaria* and its phytopathological evaluation. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 38: 397-404.
- Kohmoto, K. Otani, H. Tsuge, T.** 1995. *Alternaria alternata* pathogens. In *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases: Histopathological Biochemical, Genetic and Molecular Bases*, Vol. II. Eukaryotes. Kohmoto, K., Singh, U.S., and Singh, R.P. (eds). Oxford: Pergamon. 51-63.
- Konopińska, A.** 2004. Monitoring of *Alternaria* Ness and *Cladosporium* Link airborne spores in Lublin (Poland) in 2002. *Ann. Agric. Environ. Med.* 11: 347-349.
- Konstantinova, P. Bonants, PJM. van Gent-Pelzer, MPE. van der Zouwen, PR. van den Bulk.** 2002. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria spp.* in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. *Mycol. Res.* 106: 23-33.
- Kozlovski, B E. Kvasnyuk, NY.** 1984: Stimulation of sporulation of *Macrosporium solani* Ell. Mart. on nutrient media with potato leaf extracts. *Mikologiya i Fitopatologiya*. 18 (2): 139-140.
- Kuang-Ren, C.** 2012. Stress Response and Pathogenicity of the Necrotrophic Fungal Pathogen *Alternaria alternata* (Review). Hindawi Publishing Corporation, Scientifca. Article ID 635431. 17pp.
- Kuczynska, J.** 1992. The role and importance of the fungi from the genus *Alternaria* in early blight elicitation on potato leaves and tubers. *Biuletyn Instytutu Ziemiaka*. 41: 57-72.

- Kumar, S. Singh, R. Kashyap, PL. Srivastava, AK.** 2013. Rapid detection and quantification of *Alternaria solani* in tomato. *Scientia Horticulturae*. 151: 184-189.
- Kumar, S. Srivastava, K.** 2013. Screening of tomato genotypes against early blight under field condition. *the bioscan, an international quarterly journal of life sciences*. 8 (1): 189-193.
- Kumar, V. Haldar, S. Pandey, K. K. Singh A. K. Singh, P. C.** 2008. Cultural, morphological, pathogenic and molecular variability amongst tomato isolates of *Alternaria solani* in India. *World J Microbiol Biotechnol*. 24: 1003-1009.
- Kusaba M, Tsuge T.** 1995. Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Current Genetics*. 28: 491-498
- Kusaba, M. Tsuge, T.** 1994. Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 3055-3062.
- Langenberg, WJ. Sutton, JC. Gillespie, TJ.** 1977. Relation of weather variables and periodicities of airborne spores of *Alternaria dauci*. *Phytopathology*. 67: 879-883.
- Langsdorf, G. Furuichi, N. Doke, N. Nishimura, S.** 1991. Investigations of *Alternaria solani* infections: detection of alternaric acid and a susceptibility-inducing factor in the spore-germination fluid of *A. solani*. *J. Phytopathol*. 128: 271-282.
- Latrose, MPF. Schmitt, F. Peyrard, S. Veloso, S. Beffa, R.** 2010. Molecular Analysis of *Alternaria* Populations Early Blight Causal Agents in Potato Plants. *PPO-Special Report*. 14: 179-186.
- Lawrence, DP. Gannibal, PB. Peever, TL. Pryor, BM.** 2013. The sections of *Alternaria*: Formalizing species-groups concepts. *Mycologia*. 105: 530 -546.
- Leander, FJ. Corl, EA.** 1972. Methods for research on the ecology of soil. Borne plant pathogen. Printed in USA. 111-115.
- Leiminger, J. Bahnweg, G. Hausladen, H.** 2010. Population genetics – consequences on early blight disease. Twelfth Euro Blight workshop Arras (France), *PPO-Special Report*. 14: 171-178.
- Leiminger, J. Hausladen, H.** 2012. Wirkung verschiedener Fungizide auf den Befall der Dürrfleckenkrankheit (*Alternaria* spp.) sowie auf den Ertrag der Kartoffel. *Gesunde Pflanzen*. 63: 11-18.
- Leiminger, J. Hausladen, H.** 2013. Fungizidresistenz bei *Alternaria*. *Kartoffelbau*. 5:18- 21.
- Lepoivre, P.** 2003. *Phytopathologie*. De Boeck et Lancier, Bruxelles. 427: 320.
- Liebermann, B. Ihn, W. Baumann, E. Tresselt, D.** 1988. Dihydrotentoxin related dipeptide produced by *Alternaria alternata*. *Phytochemistry*. 27: 357-359.

- Linás, MD. Morassin, P. Recco.** 1999. Actualités sur *Alternaria*: écologie, Revue Française d'allergologie. 349- 355.
- Locke, SB.** 1948. A method for measuring resistance to defoliation diseases in tomato and other *Lycopersicon* species. *Phytopathology*. 38: 937-942.
- Logrieco, A. Bottalico, A. Solfrizzo, M. Mule, G.** 1990. Incidence of *Alternaria* species in grains from Mediterranean countries and their ability to produce mycotoxins. *Mycologia*. 82: 501-505.
- Logrieco, A. Moretti, A. Solfrizzo, M.** 2009. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*. 2 (2): 129-140.
- Loladze, A. Garland Campbell, KA. Chen, X.** 2005. Development of a detached leaf assay for stripe rust resistance screening. *Agronomy Abstracts*.
<http://crops.confex.com/crops/2005am/techprogram/P3298.HTM>
- Lopes, CA. Boiteux, LS.** 1994. Leaf spot and stem blight of sweet potato caused by *Alternaria bataticola*; a new record to South America. *Plant disease*. 78: 1107-1109.
- Lourenço, JrV. Moya, A. González-Candelas, F. Carbone, I. Maffia, LA. Mizubuti, ESG.** 2009. Molecular diversity and evolutionary processes of *Alternaria solani* in Brazil inferred using genealogical and coalescent approaches. *Phytopathology*. 99: 765-774.
- Lübeck, MPSK. Lübeck, PS. Jensen, D. Thrane, U.** 2000. Identification of *Trichoderma* strains from building materials by ITS1 ribotyping, UP-PCR fingerprinting and UP-PCR cross hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.* 129-134.
- Ma, Z. Michailides, TJ.** 2004. Characterization of iprodione resistant *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pestic. Biochem. Physiol.* 80: 75-84.
- Ma, Z. Michailides, TJ.** 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi (Review). *Crop Protection*. 24: 853-863.
- Madan, M. Thind, KS.** 1998. *Physiology of fungi*. A.P.H. Publishing Corporation, New Delhi, India.
- MADR.** 2009. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, Direction des statistiques.
- Maekawa, N. Yamamoto, M. Nishimura, S. Kohmoto, K. Kawada, M. Watanabe, Y.** 1984. Studies on host-specific AF-toxins produced by *Alternaria alternata* strawberry pathotype causing *Alternaria* black spot of strawberry. (1) Production of host- specific toxins and their biological activities. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 50: 600-609.
- Maiero, MNg. TJ Barksdale, TH.** 1990. Genetic resistance to early blight in tomato breeding lines. *HortScience*. 25: 344-346.
- Maiero, MNg. TJ. Barksdale, TH.** 1989. Combining ability estimates for early blight resistance in tomato. *J Am Soc Hort Sci*. 114:118-121.

- Makimura, KTY. Murakami, A. Kano, R. Nakamura, Y. Hasegawa, A. Uchida, K. Yamaguchi, H.** 2001. Cluster analysis of human and animal pathogenic *Microsporium* species and their teleomorphic states, *Arthroderma* species, based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer I. *Microbiol. Immunol.* 45 (3): 209-216.
- Mamgain, A. Roychowdhury, R. Tah, J.** 2013. *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. *Research Journal of Biology.* 1: 01-09.
- Manjunath, H. Sevugapperumal, N. Thiruvengadam, R. Theerthagiri, A. Ramasamy, S.** 2010. Effect of Environmental Conditions on Growth of *Alternaria alternata* Causing Leaf Blight of Noni. *World J. Agricul. Sci.* 6 (2): 171-17.
- Martin, JE. Fernández, HS.** 2006. First Report of *Alternaria* brown spot of Citrus caused by *Alternaria alternata* in Peru. *Plant Disease.* 90: 686.
- Matharu, BK. Sharma, JR. Manrao, MR.** 2006. Synthesis and antifungal potential of 2 chlorobenzal derivatives. *Pesticide Res. J.* 18 (2): 113-115.
- Mathur, RS. Barnett, HL. Lilly, VG.** 1950. Sporulation of *Coletotrichum lindemuthianum* in culture. *Phytopath.* 104.
- Mathur, SB. Sarboj, AK.** 1977. Physiological studies on *Alternaria alternata* from sugar beet. *Indian Journal of Phytopathology.* 30: 432- 434.
- Maya-Manzano, JM. Fernández-Rodríguez, S. Hernández-Trejo, F. Diaz-Perez, G. Gonzalo-Garijo, A. Si Iva-Palacios, I. Muñoz- Rodríguez, AF. Tormo –Molina, R.** 2012. Seasonal Mediterranean patterns for airborne spores of *Alternaria*. *Aerobiologia.* 28 (4): 515-526.
- Mehrotra, BS. Mehrotra, MD.** 1962. Morphological and Physiological studies of *Helicostylum piriforme* Bainier. *Phytopathol.* 45: 21- 32.
- Mehrotra, MD.** 1964. Studies on *Choanephoraceae*. II. Effect of Hydrogen- ion Concentration. *Sydowia. Ann. Mycologici. Ser.* 17: 223- 229.
- Mei, ZZ. Rong, C. Ronge, X. Lin, CX. Song, L. Yong, GZ. Xia, J. Lin, W. Cheng, LP.** 2007. Synthesis and antifungal properties of sulfonilamide derivatives of chitosan. *Carbohydrate Research.* 342 (16): 2390-2395.
- Meredith, DS.** 1966. Spore dispersal in *Alternaria porri* (Ellis) Neerg. on onions in Nebraska. *Annals of Applied Biology.* 57: 67-73.
- Mesbah, LA. van der Weerden, GM. Nijkamp, HJJ. Hille, J.** 2000. Sensitivity among species of *Solanaceae* to AAL toxins produced by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Plant Pathology.* 49: 734-741.
- Messiaen, CM. Blancard, D. Rouxel, F. Lafon, R.** 1991. Les maladies des plantes maraichères, INRA Paris. 552pp.
- Micales, JA.** 1986. The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon.* 27: 405- 449.

- Mikami, Y. Nishijima, T. Imura, H. Sužuji, A. Tamura, S.** 1971. Chemical studies on brown-spot disease of tobacco plants. Part I. tenuazonic acid as vivotoxin of *Alternaria longipes*. Agricultural and Biological Chemistry. 35: 611-618.
- Mirkarimi, HR. Abasi-moghadam, A. Mozafari, J.** 2013. *In vitro* and greenhouse evaluation for resistance to early blight of potato isolated from *Alternaria alternata*. Agricultural Sciences. 4: 473-476.
- Mirkova, E. Konstantinova, P.** 2003. First report of *Alternaria* leaf spot on gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolux ex J. D. Hook) in Bulgaria. J. Phytopathol. 151: 323-328.
- Misaghi, I J. Grogan, RG. Duniway, JM. KimbleI, KA.** 1978. Influence of environment and culture media on spore morphology of *Alternaria alternata*. Phytopathology. 68: 29-34.
- Mitakakis, T. Ong, EK. Stevens, A. Guest, D. Knox, RB.** 1997. Incidence of *Cladosporium*, *Alternaria* and total fungal spores in the atmosphere of Melbourne (Australia) over 3 years. Aerobiologia. 13: 83- 90.
- Mmbaga, MT. Shi, A. Kim, MS.** 2011. Identification of *Alternaria alternata* as a Causal Agent for Leaf Blight in *Syringa* species. Plant Pathol. J. 27 (2): 120-127.
- Mohapatra, A. Mohanty, AK. Mohanty, NN.** 1977. Studies on physiology of the sesame leaf blight pathogen, *Alternaria sesami*. Indian Phytopathology. 30: 332- 334.
- Montemurro, N. Visconti, A.** 1992. *Alternaria* metabolites chemical and biological data. In: *Alternaria* biology, plant disease and metabolites, ed. by J. Chelkowski and A. Visconti, Elsevier, Amsterdam, Netherland. 449- 558.
- Moore, WD.** 1942. Some factors affecting the infection of tomato seedlings by *Alternaria solani*. Phytology. 32: 399-403.
- Morris, PF. Connolly, MS. St Clair, DA.** 2000. Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. Mycol. Res. 104 (3): 286- 292.
- Mullis, KB. Faloona, FA. Scharf , SJ. Saiki, RK. Horn, GT. Erlich, HA.** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 263- 273.
- Mumford, R. Boonham, N. Tomlinson, J. Barker, I.** 2006. Advances in molecular phytodiagnosics– new solutions for old problems. Eur. J. Plant Pathol. 116: 1-19.
- Musetti, RR. Polizzotto, A. Vecchione, S. Borselli, L. Zulini, M. D’Ambrosio, L. Toppi, I. Pertot.** 2007. Antifungal activity of diketopiperazines extracted from *Alternaria alternata* against *Plasmopara viticola*: an ultrastructural study. Micron. 38: 643- 650.
- Mustafee, TP. Devnath, A. Chowdhary, A.** 2007. Efficacy of Dimethomorph and Dithianon against blight diseases of potato. J. Mycopathol. Res . 45 (1): 85- 89.

- Nadia, G. El-Gamal, G. Abd-El-Kareem, F. Fotouh, Y. El- Mougny, N.** 2007. Induction of systemic resistance in potato plants against late and early blight diseases using chemical inducers under greenhouse and field conditions. *Res. J. Ag. Bio. Sci.* 3: 73-81.
- Nash, AF. Gardner, RG.** 1988. Tomato early blight resistance in a breeding line derived from *Lycopersicon hirsutum* PI 126445. *Plant Dis.* 72: 206-209.
- Nasraoui, B.** 2006. Les champignons parasites des plantes cultivées. Centre de publication universitaire, Tunisie. 456: 41.
- Neergaard, P.** 1945. Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*: taxonomy, parasitism, economic significance. Oxford University Press, London. 260 -287.
- Nees, Von Esenbeck, GG.** 1817. System der Pilze Urid Schwamme, Wurzburg. 234 pp.
- Nikumbh, DF. Saler, R S.** 2011. In vitro antifungal activity of plant extracts on *Alternaria alternata* (Fr) Keisler, a potential pathogen of onion. International Conference on Biology. Environment and Chemistry. 24: 416-419.
- Nishimura, S. Kohmoto, K.** 1983. Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. *Annu. Rev. Phytopathol.* 21: 87-116.
- Nutsugah, SK. Kohmoto, K. Otani, H. Kodoma, M. Sunkeswari, RR.** 1994. Production of a hostspecific toxin by germinating spores of *Alternaria tenuissima* causing leaf spot of pigeon pea. *J. Phytopathol.* 140: 19-30.
- Ongena, M. Jacques, P.** 2008. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16: 115- 125.
- Ongena, M. Jourdan, E. Adam, A. Paquot, M. Brans, A. Joris, B. Arpigny, JL. Thonart, P.** 2007. Surfacing and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol.* 9: 1084- 1090.
- Orina, AS. Gannibal, PhB. Levitin, MM.** 2012. *Alternaria* species on potatoes on Russia. Euroblight Workshop St. Petersburg. [http://130.226.173.223/euroblight/Workshop/2011StPetersburg/PPT/05_04_Orina.pdf].
- Osiru, M.** 2008. Distribution, variability and pathogenicity of *Alternaria* leaf petiole and stem blight disease of sweetpotato in Uganda. PhD. Thesis. Makerere University, Kampala. 33-61.
- Ostry, V.** 2008. *Alternaria* mycotoxins – An overview on chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal.* 1: 175-188.
- Otani, H. Kohnobe, A. Kodama, M. Kohmoto, K.** 1998. Involvement of host factors in the production of a protein host-specific toxin produced by *Alternaria brassicicola*. *Molecular genetics of host specific toxins in plant disease.* 13: 63-69.
- Oviedo, MS. Sturm, ME. Reynoso, MM. Chulze, NS. Ramirez, LM.** 2013. Toxigenic profile and AFLP variability of *Alternaria alternata* and *Alternaria infectoria* occurring on wheat. *Braz. J. Microbiol.* 44 (2): 447-455.

- Padmanabhan, P. Narayana Swamy, P.** 1977. Growth studies of *Alternaria macrospora* zimm incitant of leaf spot disease of cotton. Madras Agricultural Journal. 64: 258-261.
- Pandey, KK. Pandey, PK. Kallo, G. Banerjee, MK.** 2003. Resistance to early blight of tomato with respect to various parameters of disease epidemics. J Gen Plant Pathol. 69: 364-371.
- Panigrahi, S.** 1997. *Alternaria* toxins. In: D'Mello, J.P.F. (Ed.) Handbook of plant and fungal toxins. CRC Press, Boca Raton, USA. 319-337.
- Papavizas, GC. Lewis, JA. Abd-El Moity, TH.** 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. Phytopathology. 72: 126- 132.
- Park, DS. Sayler, RJ. Hong, YG. Nam, MH. Yang, Y.** 2008. A method for inoculation and evaluation of rice sheath blight disease. Plant Dis. 92:1.
- Pasche, JS. Wharam, CM. Gudmestad, NC.** 2004. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* in response to QoI fungicides. Plant Dis. 88: 181-187.
- Patel, NA. Dange, SRS. Patel, SI.** 2005. Efficacy of chemicals in controlling fruit rot of tomato caused by *Alternaria tomato*. Ind. J. Agric. Res. 39 (1): 72-75.
- Patterson, C. L.** 1991. Importance of chlamydospores as primary inoculum for *Alternaria solani*, incitant of collar rot and early blight of tomato. Plant Disease. 75: 274-278.
- Pavón, MA. Lunab, A. Silvia de la Cruz González, I. Martínez, R. García, T.** 2012. PCR based assay for the detection of *Alternaria* species and correlation with HPLC determination of altenuene, alternariol and alternariol monomethyl ether production in tomato products. Food Control. 25: 45-52.
- Pawar, VH. Patel, MK.** 1957. *Alternaria* leaf spot of *Ricinus cumunis* L. Indian Phytopathology. 10: 110-114.
- Pearson, RC. Hall, DH.** 1975. Factors affecting the occurrence and severity of blackmold of ripe tomato fruit caused by *Alternaria alternata*. Phytopathology. 65: 1352-1359.
- Peever, TL. Ibañez, A. Akimitsu, K. Timmer, LW.** 2002. Worldwide phylogeography of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. Phytopathology. 92: 794-802.
- Pelletier, J. Fry, W.** 1989. Characterization of resistance to early blight in three potato cultivars: Incubation period, lesion expansion rate, and spore production. Phytopathology. 9: 511-517.
- Pennypacker, BW.** 1981. Biochemistry and physiology of pathogenesis in fungal wilts diseases of plants. Mace (M.E.), Bell (A.A.), Backmann (C.H.) (Ed.), New York: Academic Press.
- Peralta, IE. Spooner, DM.** 2001. Granule-Bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). Am. J. Bot. 88: 1888-1902.

- Peralta, IE. Knapp, S. Spooner, DM.** 2005. New species of wild tomatoes (*Solanum section Lycopersicon: Solanaceae*) from Northern Peru. *Sys Bot.* 30: 424-4.
- Peralta, IE. Knapp, S. Spooner, DM.** 2006. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. Report of the tomato genetics cooperative. 56: 5-12.
- Peréz, S. Martínéz, B.** 1999. Infection of tomato cultivars by *Alternaria solani* (E & M) J & G. *Revista de Protección Vegetal.* 14:1- 5.
- Pérez-Gacia, A. Romeo, D. de Vicente, A.** 2011. Plant protection by microorganisms : biotechnological applications of bacilli in agriculture. *Current opinion in biotechnology.* 22: 187-193.
- Pero, RW. Main, CE.** 1969. Chlorosis of tobacco induced by alternariol monomethyl ether produced by *Alternaria tenuis*. *Phytopathology.* 60: 1570-1573.
- Pero, RW. Posner, H. Blois, M. Harvan, D. Spalding, JW.** 1973. Toxicity of metabolites produced by the '*Alternaria*'. *Environmental Health Perspectives.* 4: 87-94.
- Petrunak, DM. Christ, BJ.** 1992. Isozyme variability in *Alternaria solani* and *A. alternata*. *Phytopathology.* 82:1343-1347.
- Pitt, J. Hocking, AD.** 1997. *Fungi and food spoilage.* 2eme ed. BlackieAcademic and Professional. London.
- Pollock, GA. DiSabatino, CE. Heimsch, RC. Hilbelink, DR.** 1982. The subchronic toxicity and teratogenicity of alternariol monomethyl ether produced by *Alternaria solani*. *Food Chemical Toxicology.* 20: 899-902.
- Pose, G. Patriarca, A. Kyanko, V. Pardo, A. Fernández Pinto, V.** 2010. Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *Inter. J. Food Microbiol.* 142: 348 -353.
- Pound, GS. Stahmann, MA.** 1951. The production of a toxic material by *Alternaria solani* and its relation to early blight disease of tomato. *Phytopathology.* 41:1104-1114.
- Poysa, V. Tu, JC.** 1996. Response of cultivars and breeding lines of *Lycopersicon* spp. to *Alternaria solani*. *Can Plant Dis Surv.* 76:5-8.
- Prasad, Y. Naik, MK.** 2003. Evaluation of genotypes, fungicides and plant extracts against early blight of tomato caused by *Alternaria solani*. *Ind. J. Pl. Protec.* 31(2): 49-53.
- Pryor, BM. Gilbertson, RL.** 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research.* 104: 1312-1321.
- Pryor, BM. Mchailides, TJ.** 2002. Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology.* 92: 406-416.

- Pusey, PL. Wilson, CL.** (1984). Postharvest biological control of stone fruit brown rot of bacillus subtilis. Plant diseases. 68: 753- 756.
- Pusz, W.** (2009). Morpho-physiological and molecular analyses of *Alternaria alternata* isolated from seeds of *Amaranthus*. Phytopathologia. 54: 5-14.
- Qin, GZ. Tian, SP.** 2004. Biocontrol of postharvest diseases of jujube fruit by *Cryptococcus laurentii* combined with a low doses of fungicides under different storage conditions. Plant Diseases. 88 (5): 497- 501.
- Qin, GZ. Tian, SP. Xu, Y.** 2004. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonists yeasts in different storage conditions. Postharvest biology and technology. 31 (1): 51-58.
- Rabbani, N. Bajwa, R. Javaid, A.** 2011. Influence of culturing conditions on growth and sporulation of *Drechslera hawaiiensis*, the foliar blight pathogen of Marsileaminuta L. Afr. J. Biotechnol. 10 (10): 1863-1872.
- Rahman, MZ. Honda, Y. Islam, SZ. Muroguchi, N. Arase, S.** 2002. Leaf Spot Disease of Broad Bean (*Vicia faba* L.) Caused by *Alternaria tenuissima*-A New Disease in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 68: 31-37.
- Rai, PK. Kumari, L.** 2009. Variability in *Alternaria alternata* infecting periwinkle (*Catharanthus roseus*). Progr. Agric. 9: 269-272.
- Raistrick, H. Stickings, CE. Thomas, R.** 1953. Studies in the biochemistry of micro- organisms. 90. Alternariol and alternariol monomethyl ether, metabolic products of *Alternaria tenuis*. Biochemical Journal 55: 421-433.
- Ramgiry, SR. Tomar, IS. Tawar, ML.** (1997). Studies on microflora associated with pre and post-harvest tomato fruits. Crop Reserch (Hisar). 13 (1): 231-233.
- Ramjegathesh, R. Ebenezar, EG.** 2012. Morphological and Physiological Characters of *Alternaria alternata* Causing Leaf Blight Disease of Onion. International Journal of Plant Pathology. 3: 34-44.
- Rane, MS. Patel, MK.** 1956. Disease of cotton in Bombay-I, *Alternaria* leaf spot. Indian Phytopathology. 9: 106-113.
- Reni, CG. Rimmelt, S. Roeland, EV.** 2007. Assessment of early blight (*Alternaria solani*) resistance in tomato using a droplet inoculation method. J. Gen. Plant Pathol. 2 (73): 96-103.
- Reynard, GB. Andrus, CF.** 1945. Inheritance of resistance to the collar rot phase of *Alternaria solani* on tomato. Phytopathology. 35: 25-3.
- Rizk, AM. Hammouda, FM. El-Missiry, MM. Mayergi, HA. Lashin, SM. Nofal, MA.** 1985. Mycotoxins of *Lolium* seeds in response to fungal infections. Annals of Agricultural Science, Ain Shama University. 30: 607-615.

- Roberts, JW.** 1924. Morphological characters of *Alternaria mali* (Roberts). J. Agric. Res. 27: 699-712.
- Roberts, RG. Reymond, ST. Andersen, B.** 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. Mycological Research. 104 (2): 151-160.
- Rodrigues, TTMS. Berbee, ML. Simmons, EG. Cardoso, CR. Reis, A. Maffia, LA. Mizubuti, ESG.** 2010. First report of *Alternaria tomatophila* and *A. grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. New Disease Reports. 22-28.
- Rodríguez, NV. Kowalski, B. Rodríguez, LG. Carabaloso, IB. Suárez, MA. Pérez, PO. Quintana, CR. González, N. Ramos, RQ.** 2007. *In vitro* and *ex vitro* selection of potato plantlets for resistance to early blight. J. Phytopath. 155: 582-586.
- Romeo, D. de Vincente, A. Racotoaly, RH. Dufour, SE. Veenig, JW.** 2007. The iturin and fungecin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. Mol Plant-Microbe interact. 20: 430- 440.
- Rosas, I. Escamilla, B. Calderón, C. Mosiño, P.** 1990. The daily variations of airborne fungal spores in Mexico City. Aerobiologia, 6: 153-158.
- Rotem, J.** 1994. The genus *Alternaria*, biology and pathogenicity. APS Press, St. Paul, Minnesota. 326pp.
- Rotem, J.** 2004. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, USA.
- Saad, S. Heagedorn, DJ.** 1970. Growth and nutrition of *Alternaria* Pathogenic to Snapbeans. Phytopathology. 60: 903-906.
- Sabriye, Y. Yanar, Y. Karaman, I.** 2011. Evaluation of bacteria for biological control of early blight disease of tomato. African journal of biotechnology. 10 (9): 1573- 1577.
- Saccardo, PA.** 1886. Hyphomyceteae. In: Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum. Pavia, Italy. 4: 807pp.
- Saha, A. Mandal, P. Dasgupta, S. Saha, D.** 2008. Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. J. Environ. Biol. 29(3): 407-410.
- Salam, AA. Jarjees, MM. Juer, KS.** 2006. Enhancement of *Alternaria solani* isolates for sporulation on culture media and evaluation of their pathogenicity. State Board for Agricultural Research, College of Agricultural, University of Baghdad, Abo-Gharib, Baghdad, Iraq.
- Salemi, MK. Khan, MZ. Khan, A. Javed, I. Ul Hasan, Z. Hameed, MR. Hameed, S. Mehmood, MA.** 2012. Occurrence of toxigenic fungi in maize and maize-gluten meal from Pakistan. Phytopathologia Mediterranea. 51(1): 219-224.

- Samson, RA. Hoekstra, ES. Frisvad, JC. Filtenborg, O.** 2002. Introduction to food- and air borne fungi. 6th ed. Utrecht: Central bureau voor Schimmel cultures. 379pp.
- Sandrock, RW. Vanetten, HD.** 1998. Fungal sensitivity to and enzymatic degradation of the phytoanticipin alpha-tomatine. *Phytopathology*. 88: 137-143.
- Sarbhoj, AK.** 1965. Nutritional studies of some members of Mucorales. VII. *Mycopath. Mycol. Appl.* 27: 120-128.
- Sarkar, SC. Chowdhary, AK.** 2004. Bio-efficacy of polyram against *Alternaria solani* causing early blight disease of tomato. In: 56th Annual Meeting held at IARI, New Delhi. 19-21.
- Sartorato, A.** 2002. Identification of *Phaeoisariopsis griseola* pathotypes from five states in Brazil. *Fitopathol. Brasil.* 27: 78-81.
- Savile, DBO.** 1954. Cellular mechanics, taxonomy and evolution in the *Uredinales* and *Ustilaginales*. *Mycologia*. 46: 736-761.
- Saxena, RK. Sangetha, L. Vohra, A. Gupta, R. Gulati, R.** 2001. Induction and mass sporulation in lignin degrading fungus *Ceriporiopsis subvermispora* for its potential usage in pulp and paper industry. *Curr. Sci.* 81: 591-594.
- Schaechter, M.** 2009. Desk encyclopedia of microbiology. 2^{ème} edition, Université de San Diego. USA. 1259 pages: 6.
- Scott, PM.** 2001. Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins, *Journal of AOAC International*. 84: 1809- 1817.
- Scott, PM.** 2004. Other mycotoxins. In: Magan, N. and Olsen, M. (Eds.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England. 406- 409.
- Setti, B. Bencheikh, M. Henni, JE. Neema, C.** 2011. Morphological and virulence variation among isolates of *Mycosphaerella pinodes* the causal agent of pea leaf Blight. *Afr. J. Agricul. Res.* 6 (5): 1067-1075.
- Shahbazi, H. Aminian, H. Sahebani N. and Halterman, D.** 2011. Effect of *Alternaria solani* Exudates on Resistant and Susceptible Potato Cultivars from Two Different pathogen isolates. *Plant Pathol. J.* 27 (1): 14-19.
- Shaner, G. Finney RE.** 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology*. 67: 1051-1056.
- Sharma, G. Pandey, RR.** 2010. Influence of culture media on growth, colony character and sporulation of fungi isolated from decaying vegetable wastes. *J. Yeast and Fungal Res.* 1 (8): 157-164.
- Sharma, RR. Dinesh, S. Rajbir, S.** 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*. 50: 205-221.
- Sherf, AF. MacNab, AA.** 1986. Vegetable diseases and their control. Wiley, New York.

- Shtienberg, D. Blachinsky, D.** 1996. Effects of growing season and fungicide type on the development of *Alternaria solani* and on potato yield. *Pl. Dis.* 80 (9): 994-998.
- Sidlauskiene, A. Rasiniskiene, A. Surviliene, E.** 2003. Effect of various protection means on *Alternaria* diseases of tomato, cucumber and cabbage seed plants. *Sodininkyste-ir-Darzininkyste.* 22 (3): 388-394.
- Simmons, EG.** 1967. Typification of *Alternaria*, *Stemphylium* and *Ulocladium*. *Mycologia.* 59: 67-92.
- Simmons, EG.** 1986. *Alternaria* terms and variations. (22- 26). *Mycotaxon. (Pleospora/ Stemphylium and Lewia/Alternaria).* 25: 287-308.
- Simmons, EG.** 1992. “*Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, change,” in *Alternaria* Biology, Plant Disease and Metabolites, J. Chelkowski and A. Visconti, Eds. Elsevier, Amsterdam. The Netherlands. 1- 35.
- Simmons, EG.** 2000. *Alternaria* themes and variations (244-286) species on *Solanaceae*. *Mycotaxon.* 75: 1-115.
- Simmons, EG.** 1995. *Alternaria* themes and variations (112–144). *Mycotaxon.* 55: 55-163.
- Simmons, EG.** 2007. *Alternaria*. An Identification Manual. : CBS Biodiversity Series No. 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775 pp.
- Simmons, EG.** 1993. *Alternaria* themes and variations (63-72). *Mycotaxon.* 48: 91-107
- Simmons, EG.** 1999. *Alternaria* themes and variations (236-243). Host-specific toxin producers. *Mycotaxon.* 70: 325- 69.
- Simmons, EG. Roberts, RG.** 1993. *Alternaria* themes and variations (73). *Mycotaxon.* 48: 109-140.
- Singh, A.** 2008. Efficacy of new fungicides in the management of early and late blight of potato. *Ind. Phytopathol.* 61 (1): 134- 135.
- Singh, M. Singh, RR. Narain, U.** 1997. Efficacy of different fungicides for control of early blight of potato caused by *Alternaria solani*. *Ann. Pl. Protec. Sci.* 5 (1): 114-115.
- Singh, NK. Saxena, RP. Pathak, SP. Chauhan, SKS.** 2001. Management of *Alternaria* leaf spot disease of tomato. *Ind. Phytopathol.* 54: 508.
- Singh, PC. Singh, D.** 2006. In vitro evaluation of fungicides against *Alternaria alternata*. *Ann. Pl. Protec. Sci.* 14 (2): 500- 502.
- Singh, RS.** 1987. *Diseases of Vegetable Crops.* Oxford and IBH Pub. Co. Pvt. Ltd., New Delhi, Bombay, Calcutta. 419pp.
- Singh, RP. Singh, AK. Singh, RN.** 2003. Pathogenic variability in *Alternaria triticina* causing leaf blight of wheat. *Ann. Plant Protect. Sci.* 11: 309-311.

- Slavov, S. Mayama, S. Atanassov, A.** 2004. Some aspects of epidemiology of *Alternaria alternata* tobacco pathotype. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 18: 85-89.
- Snoussi, SA.** 2009. Etude de base sur la tomate en Algérie. Programme régional de gestion intégrée des ravageurs pour le Proche-Orient. www.ipm-neareast.com
- Snowdon, AL.** 1991. A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Wolfe scientific. London.
- Sofi, TA. Muzafer, A. Beig, GH. Hassan, D. Mushtaq, A. Aflaq, H. Ahangar, FA. Padder, BA. Shah, MD.** 2013. Cultural, morphological, pathogenic and molecular characterization of *Alternaria mali* associated with *Alternaria* leaf blotch of apple. *African Journal of Biotechnology.* 370-381.
- Solfrizzo, M. Girolamo, AD. Vitti, C. Tylkowska, K. Grabarkiewicz- Szczesna, J. Szopinska, D. Dorna, H.** 2005. Toxigenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants. *Food Additives and Contaminants.* 22: 302–308.
- Song, W. Ma, X. Tan, H. Zhou, J.** 2011. Abscisic acid enhances resistance to *Alternaria solani* in tomato seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 49: 693-700.
- Spolder, J. Ellens, R. Turkensteen, L.** 2013. Comparing pathogenicity of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* in potato. Fourteen Euroblight Workshop. Special report. 16: 97-102.
- Spooner, DM. Peralta, IE. Knapp, S.** 2005. Comparaison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. *Taxon.* 54: 43-61.
- Spurr, HWJr.** 1977. Protective applications of conidia of non-pathogenic *Alternaria alternata* isolates for control for brown tobacco brown spot disease. *Phytopathology.* 67: 128- 132.
- Stammler, G. Bohme, F. Philippi, J. Miessner, S. Tegge, V.** 2014. Pathogenicity of *Alternaria*-species on potatoes and tomatoes. Fourteenth Euroblight Workshop PPO – Special Report. 16: 85-96.
- Stancheva, I.** 1991. Inheritance of the resistance to injuries on the growth mass caused by *Alternaria solani* in the tomato. *Genetikai- Seleksiya.* 24: 232- 236
- Stancheva, I. Stamova, L.** 1991. Study of the susceptibility of some tomato varieties to *Alternaria solani*. *Rasteniyev dini Nauki.* 25 (10): 62-65.
- Sten net, PJ. Beggs, PJ.** 2004. *Alternaria* spores in the atmosphere of Sydney, Australia, and relationships with meteorological factors. *Int. J. Biometeorol.* 49: 98-105.
- St-Germain, G. Summerbell, R.** 1996. Identifying Filamentous Fungi – A Clinical Laboratory Handbook, 1st Ed. Star Publishing Co., Belmont, California. USA. 314pp.
- Stoessl, A.** 1969. Metabolites of *Alternaria solani*. *Canadian Journal of Chemistry.* 47: 767-776.

- Strandberg, JO.** 1992. *Alternaria* species that attack vegetable crops: biology and options for disease management: In: Chelkowski J, Visconti A (eds) *Alternaria* biology, plant disease and metabolites. Elsevier, Amsterdam. 175- 208.
- Suassuna, ND. Maffia, LA. Mizubuti, EGS.** 2004. Agressivensess and host specificity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*. 53: 405- 413.
- Taba, S. Takara, A. Nasu, K. Miyahira, N. Takushi, T. Moromizato, Z.** 2009. *Alternaria* leaf spot of basil caused by *Alternaria alternata* in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 75: 160-162.
- Tadakazu, N. Ueno, T. Fukami, H. Taga, T. Masuda, H. Osaki, K. Otani, H. Kohmoto, K. Nishimura, S.** 1985. Isolation and structures of AK-toxins I and II, host-specific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *Agricultural and Biological Chemistry*. 49: 807- 816.
- Tandon, RN.** 1961. Physiological studies on some pathogenic fungi. Uttar Pradesh Science and Research Committee. Monograph. 38-80.
- Taralova, EH. Schlecht, J. Kobus, B. Barry, MP.** 2011. Modelling and visualizing morphology in the fungus *Alternaria*. *Fungal pathology*. 115: 1163-1173.
- Tatiana, T.M.S. Rodrigues, Luiz A. Maffia, Onkar D. Dhingra, Eduardo S.G. Mizubuti.** 2010. *In vitro* production of conidia of *Alternaria solani*. *Tropical Plant Pathology*. 35 (4): 203- 212.
- Templeton, GE. Grable, CI. Fulton, ND. Meyer, WL.** 1967. Tentoxin from *Alternaria tenuis*: its isolation and characterization. In: USDA (Ed.) Proceedings of the 1967 mycotoxin research seminar. Washington D.C. USA. 27-29.
- Tendulkar, SR. Saikumari, YK. Patel, V. Raghotama, S. Munshi, TK. Balaram, P. Chatto, BB.** 2007. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *J App Microbiol*. 103: 2331-2339.
- Tetarwal, ML. Rai, PK. Shekhawat, KS.** 2008. Morphological and pathogenic variability of *Alternaria alternata* infecting senna (*Cassia angustifolia*). *J. Mycol. Plant Pathol.* 38: 375- 377.
- Thippeswamy, B. Krishnappa, M. Chakravarthy, CN. Sathisha, AM. Jyothi, SU. Kumar, KV.** 2006. Pathogenicity and management of Phomopsis blight and leaf spot in brinjal caused by Phomopsis vexans and *Alternaria solani*. *Ind. Phytopathol.* 59 (4): 475-481.
- Thirthamallappa, T. Lohithaswa, H. C.** 2000. Genetics of resistance to early blight (*Alternaria solani* Sorauer) in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Euphytica*. 113: 187-193.
- Thomma, BPHJ.** 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*. 4: 225-236.
- Tian, SP. Qin, GZ. Xu, Y.** 2005. Synergistic effects of combining biocontrol agents with silicon against postharvest diseases of Jujube fruit. *Journal of Food protection*. 68 (3): 544- 550.

- Tirilly, Y. Bourgeois, CM.** 1999. Technologie des légumes. Tech & Doc. Lavoisier. Collection Sciences & techniques agroalimentaires. 558 pp.
- Tirokata, H. Ohkawa, M. Sassa, T. Yamada, T. Ohkawa, H. Tanaka, H. Aoki, H.** 1969. Studies on resistance of Japanese pears to black spot disease fungus (*Alternaria kikuchiana*) VIII. Alternariol and its monomethyl ether. Annals of the Phytopathological Society of Japan. 35: 62-66.
- Tiwari, RKS. Rajput, ML. Singh, A.** 2004. Effect of sowing dates and spray schedule of Mancozeb on early blight *Alternaria solani* [(Ell. & Mart.) Jones & Grout] of potato. Ind. J. Pl. Protec. 32 (2): 61-64.
- Tomlin, CDS.** 2000. The Pesticide Manual, 12th edition, tomato British Crop Protection Council, Surrey, UK. 578-580.
- Tong, YJ. Liang, J. Xu.** 1997. Study on the biology and pathogenicity of *Alternaria solani* on tomato. Journal of Jiangsu Agricultural College. 15 (3): 29- 31.
- Trail, F. Köller, W.** 1993. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: purification and characterization of two cutinases from *Alternaria brassicicola*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 42: 205-220.
- Treikale, O. Rude, O. Pugacheva, J. Lazareva, L.** 2008. The development of *Alternaria solani* Sor. On potatoes cultivated in monoculture. Zemdirbyste-Agriculture. 95 (3): 202-208.
- Tsuge, T.** 2003. Studies on pathogenicity genes of *Alternaria alternata*. J. Gen. Plant Pathol. 69: 418-420
- Turkensteen, J. Spoelder, J. Mulder, A.** 2010. Will the real *Alternaria* stand up please – Experiences with *Alternaria*-like diseases on potatoes during the 2009 season in the Netherlands. In Schepers, H. T. A. M. PPO-Special Report no. 14. DLO Foundation. Wageningen. 165-170.
- Ueno, T. Nakashima, T. Hayashi, Y. Fukami, H.** 1975. Structures of AM-toxin I and II, host-specific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria mali*. Agricultural and Biological Chemistry. 39: 1115-1122.
- UIPP.** 2011. Rapport annuel 2011-2012 édité par la Direction de la communication de l'Union des industries de la protection des plantes (UIPP). 43pp.
- UKNCC.** 1998. Growth and Media Manuals. Strain databases (www.ukncc.co.uk/)
- Utkhede, RS. Sholberg, PL.** 1986. *In vitro* inhibition of plant pathogens: *Bacillus subtilis* and *Enterobacter aerogenes* *in vivo* control of two postharvest cherry diseases. Canadian Journal of Microbiology. 32: 963-967.
- Vakalounakis, DJ.** 1983. Evaluation of tomato cultivars for resistance to *Alternaria* blight. Ann. Appl. Biol. 102:138-139.

- Van den Heuvel, J.** 1971. Antagonism between pathogenic and saprophytic *Alternaria* species on bean leaves. In Ecology of leaf surface micro-Organisms. (T. E. Preece and C. H. Dickinson, eds.). Academic Press. New York.
- van der Walls, JE. Korsten, L. Slippers, B.** 2004. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. Plant Dis. 88: 959-964.
- van Dyke, CG. Trigano, RN.** 1987. Light and scanning electron microscopy of the interaction of the biocontrol fungus *Alternaria cassiae* with sicklepod (*Cassia obtusifolia*). Can. J. Plant Pathol. 9: 230-235.
- van der Walls, JE. Korsen, L. Aveling, TAS. Denner, FDN.** 2003. Influence of Environmental Factors on Field Concentrations of *Alternaria solani* Conidia above a South African Potato Crop. Phytoparasitica. 31 (4): 353-364.
- van der Walls, JE. Korsen, L. Aveling, TAS.** 2001. A review of early blight of potato. Afr. Plant Protect. 70: 91-102.
- Verma, M. Brar, SK. Tyagi, RD. Surampalli, RY. Valéro, JR.** 2007. Antagonistic fungi *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. Biochemical engineering. 37: 1-20.
- Verma, N. Verma, S.** 2010. *Alternaria* diseases of Vegetable Crops and New Approaches for its Control. Asian Journal of Experimental Biological Sciences.1: 681-692.
- Verscheure, M. Lognay, G. Marlier, M.** 2002. Revue bibliographique : les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 6 (3): 131-142.
- Veverka, K. Stolcova, J. Ruzek, P.** 2007. Sensitivity of fungi to urea, ammonium nitrate and their equimolar solution UAN. Pl. Protec. Sci. 43 (4): 157-164.
- Vijayalakshmi, M. Madhavi, M. Kavitha, A.** 2012. Studies on *Alternaria porri* (Ellis) Ciferri pathogenic to Onion (*Allium cepa* L.). Archives of Applied Science Research. 4 (1):1-9.
- Vloutoglou, I.** 1999. Evaluation of tomato cultivars and hybrids for resistance to *Alternaria solani* infection. Tests of Agrochemicals and Cultivars. 20: 48-49.
- Visconti, A. Bottalico, A. Solfrizzo, M. Palmisano, F.** 1988. Isoaltenuene, a new metabolite of *Alternaria alternata*. Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology. 1: 139-140.
- Visconti, A. Sibilio, A.** 1994. *Alternaria* toxins. In: Miller, J.D. and Trenholm, H.L. (Eds.) Mycotoxins in grain. Eagan Press, St. Paul, MN, USA. 315-336.
- Visconti, A. Chelkowski, J.** 1992. *Alternaria*-Biology, plant diseases and metabolites, Elsevier Verlag, Amsterdam.
- Vloutoglou, I. Kalogerakis, SN.** 2000. Effects of inoculum concentrations, wetness duration and plant age on development of early blight (*Alternaria solani*) and on shedding of leaves in tomato plants. Plant Pathol. 49: 339-345.

- Vloutoglou, I. Kalogerakis, SN. Darras, A.** 2000. Effects of isolate virulence and host susceptibility on development of early blight (*Alternaria solani*) on tomato. Bulletin- OEPP. 30 (2): 263-267.
- Von Ramma, C.** 1962. Histological studies of infection by *Alternaria Longipes* on tobacco. Phytopathologische Zeitschrift. 45: 391-398.
- Wang, HK. Zhang, TY. Zhang, M.** 2001. Application of sequencing of 5.8S rDNA, ITS1 and ITS2 on identification and classification of *Alternaria* at species level. Mycosystema. 20 (2): 168-173.
- Ward, JH.** 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. J. Am. Statist. Assoc. 58: 236-244.
- Wehmeyer, L E.** 1961. A world monograph of the genus pleospora and its segregates. University of Michigan Press. Ann Arbor. 451pp.
- Weir, TL. Huff, DR. Christ, BJ. Romaine, CP.** 1998. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata*. Mycologia. 90: 813-821.
- White, TJ. Bruns, T. Lee, S. Taylor, J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA. 315-322
- Wiltshire, SP.** 1933. The foundation species of *Alternaria* and *Microsporium*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 18: 135-160.
- Wiltshire, SP.** 1938. The original and modern conceptions of *Stemphylium*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 21: 211-239.
- Woudenberg, JHC. Groenewald, JZ. Binder, M. Crous, PW.** 2013. "Alternaria redefined," Mycology. 75: 171-212.
- Xia, S. Tian-Yu, Z.** 2008. Morphological and molecular characterization of *Alternaria* isolates on fruits of *Pyrus bretschneideri* Rehd. "Ya Li". Mycosystema. 27 (1): 105-117.
- Xiangcheng, Z. Chad. V, Liangcheng, D.** 2008. Functional Complementation of Fumonisin Biosynthesis in *FUM1*-Disrupted *Fusarium Verticillioides* by the AAL-Toxin Polyketide Synthase Gene *ALT1* from *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*. J. Nat. Prod. 71: 957-960.
- Xiufen, Y. Dewen, Q. Hongmei, Z. Jingjing, Y. Jianjun, M.** 2009. Purification and characterization of a glycoprotein elicitor from *Alternaria tenuissima*. Microbiol Biotechnol. 25: 2035-2042.
- Yao, C. Köller, W.** 1995. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: different cutinases are expressed during saprophytic stages of *Alternaria brassicicola*. Physiological and molecular Plant pathology. 8: 122- 130.

- Yedidia, I. Benchamou, N. Kapulnik, Y. Chet, I.** 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant physiol. Biochem.* 38: 863- 873.
- Yifei, W. Yihong, B. Danhong, S. Wu, F. Ting, Y. Jia, W. Xiao, DZ.** 2008. Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. *International journal of food microbiology.* 123: 234- 239.
- Young, AB. Davis, ND. Diener, UL.** 1980. The effect of temperature and moisture a tenuazonic acid production by *Alternaria tenuissima*. *Phytopathology.* 70: 607-609.
- Yu, W. Yu, FY. Undersander, DJ. Chu, FS.** 1999. Immunoassay of selected mycotoxins in hay, silage and mixed feed. *Food Agricultural Immunology.* 11: 307-319.
- Zain, ME. Razak, AA. El-Sheikh, HH. Soliman, HG. Khalil, AM.** 2009. Influence of growth medium on diagnostic characters of *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Afr. J. Microbiol. Res.* 3 (5): 280-286.
- Zarzov, P. Boucherie, H. Mann, C.** 1997. A yeast heat shock transcription factor (Hsf1) mutant is defective in both Hsc82/Hsp82 synthesis and spindle pole body duplication. *J Cell Sci.* 1879-1891.
- Zhang, TY.** 2003. *Flora Fungorum Sinicorum*, vol. 16, The genus *Alternaria*. Science Press, Beijing. 1- 281.

Annexes

ANNEXE 1

Publications sur le sujet

i. Article : Bessadat, N. Benichou, S. Kihal, M. Henni, J E. (2014). Aggressiveness and morphological variability of small spore *Alternaria sp.* isolated from Algeria. Journal of Experimental Biology and Agricultural researches. 2(2S): 265-278.

ii. Article : Bessadat, N. Simoneau, P. Benichou, S. Setti, B. Kihal, M. Henni, JE. (2014). Morphological, physiological and pathogenic variability of small-spore *Alternaria* causing leaf blight of *Solanaceae* in Algeria. African journal of microbiology Research. 8 (37) : 3422-3434.

Communication affichée

1- Isolement, identification et caractérisation des *Alternaria sp.* responsables de la détérioration des plantes maraichères par des systèmes enzymatiques et moléculaires. Le 28 Novembre 2012 à l'Université d'Oran (Campus Taleb Mourad). 4eme journée des doctorants.

2- Caractérisation morphologique, physiologique et pathogène des *Alternaria alternata* responsables de la détérioration des *Solanacées*. Le 28, 29 et 30 Mai 2013 à l'université Hassiba Benbouali de Clef. Séminaire international « protection des cultures stratégiques en Algérie : situation et perspectives ».

ANNEXE 2

Milieux de cultures

Milieu à base de décoction de tomates (Kozlovski et Kvasnyuk, 1984)

- Feuilles ou fruits de tomate 200 g
- Saccharose 12g
- Agar-agar 20g

Les morceaux feuilles de tomates ou fruits découpé en morceaux sont infusés dans un ballon avec couvercle dans environ 800 ml d'eau distillée pendant 15min. Après cuisson le liquide est filtré à travers une étamine et mélangé au saccharose et à l'agar-agar, le volume final est ajusté à 1 litre puis stérilisé à l'autoclave.

Milieu PSA (Samson *et al.*, 2002)

- Pommes de terre 200 g
- Saccharose 20 g
- Agar-agar 20 g

Les morceaux de pommes de terre pelées sont cuits dans un ballon avec couvercle dans environ 800 ml d'eau distillée pendant 30min. Après cuisson le liquide est filtré à travers une

étamine et mélangé au saccharose et l'agar-agar et rempli jusqu'à 1 litre puis stérilisé à l'autoclave.

Milieu PCA (Simmons, 2007)

- Pommes de terre 40 g
- Carotte 40g
- Agar-agar 20 g

Les morceaux de pommes de terre et de carottes pelé sont cuits dans un ballon avec couvercle dans environ 500 ml d'eau distillée pendant 30min. Après cuisson le liquide est filtré à travers une étamine et mélangé à l'agar-agar et rempli jusqu'à 1 litre puis stérilisé à l'autoclave.

MEA (Messiaen *et al.*, 1991)

- Extrait de malt 10 g
- Agar agar 18 g
- 1 litre d'eau distillée.

Czapek-Dox agar (Salam *et al.*2006).

- NaNO_3 2 g
- K_2HPO_4 1 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g
- KCl 0.5 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg
- Saccharose 30 g
- Agar 20 g
- Eau distillée 1 litre

Sabouraud (Dongyou Liu, 2010).

- Peptone 10 g
- Glucose 20 g
- Agar-agar 15 g
- Eau distillée (qsp) 1 000 ml
- vitamines et facteurs de croissance
- pH = 6,0
- Chloramphénicol à 0,5 g/l

Milieu Agar 2% (Rotem, 1994).

- Agar- agar 20 g
- Eau distillée 1 litre

ANNEXE 3**Protocole d'extraction de l'ADN génomique chez les champignons (miniprep)**

- 1- Prélever un échantillon de mycélium de 0,5cm² placé au fond d'un tube eppendorf de 1,5ml
- 2- Ajouter 100µl de tampon de lyse
- 3- Placer le reste du tampon de lyse au bain-marie à 80°C
- 4- Placer l'échantillon au microonde (850 W) avec couvercle ouvert pendant 15sec, 10sec et 5sec et entre chaque traitement 5 à 10sec pour éviter que le mélange boue.
- 5- Ajouter 300µl de tampon de lyse à 80°C
- 6- Incuber au bain marie à 80°C pendant 10min
- 7- Ajouter 1 volume (400µl) phénol-chlo-iso (25 : 24 : 1) vortexer 15sec
- 8- Centrifugation à 15000g pendant 15min
- 9- Récupérer la phase aqueuse (350µl) dans un nouveau tube
- 10- Ajout de 10µl d'acétate de potassium 5M 180µl d'isopropanol
- 11- Incuber 5min dans la glace (minimum)
- 12- Centrifuger à 10min à 10000g
- 13- Eliminer le surnageant, laver le culot dans 250µl d'éthanol à 80%
- 14- Centrifuger 5min à 10000g et éliminer le surnageant
- 15- Sécher au speed vac 5 min
- 16- Reprendre le culot dans 100µl de TE (10Mm Tris-HCl, 0,1Mm EDTA, pH=8.0)

NB : Diluer si nécessaire au 10ème après essais de migration sur gel.

Tampon de lyse pour (20 ml)

- 1ml Tris-HCl à 1M pH=7,2
- 2ml EDTA à 0,5M
- 3ml SDS 20%
- 200 µl 2-mercaptoethanol
- 14ml d'eau bi-distillée stérile

ANNEXE 4**Mélange réactionnel de PCR**

Un mélange standard de 50 μ l se compose de :

- 2 μ l de solution contenant l'ADN matrice,
- 10 μ l de tampon de la polymérase Tpn5 \times
- 3 μ l d'une solution de MgCl₂ qui permet un fonctionnement optimal de l'enzyme
- 1 μ l des mononucléotides ou DNTP (dATP, dTTP, dCTP, dDTP) pour la synthèse des nouveaux brins d'ADN,
- 1 μ l des amorces
- 0.2 μ de Taq polymérase.

Le volume est complété par de l'eau stérile milliQ. Tous les ingrédients sont mélangés dans la glace afin que les réactions d'hybridation et d'élongation non spécifiques soient limitées.

ANNEXE 5**Protocole de préparation d'un gel d'agarose en tampon TAE (UMR Pa Vé, FUNGISEM Angers 2013)**

Ce mode opératoire décrit la préparation d'un gel nécessaire à la réalisation d'une électrophorèse horizontale en gel d'agarose.

Tampon TAE :

- Tris 40mM
- Acétate de sodium 4mM
- EDTA 1mM
- pH 7.9

Le tampon TAE est préparé sous forme de stock concentré 10X. Le tampon 10X est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 30min ou à 110°C pendant 45min et conservé à 4°C. Il est ensuite utilisé dans des conditions non stériles. Le tampon 5X est préparé en diluant 10X dans de l'eau distillée et est conservé à température ambiante.

Composition du tampon TAE 10X

- Trisma base 48,5 g/l (121,1 g/mol)
- Acétate de sodium 5,45 g/l (3H₂O : 136,08 g/mol)
- ou acétate de sodium anhydre 3,28g/l (anhydre : 82,03g/mol)
- EDTA 3.72g/l (372,27g/mol)
- 1L d'eau distillée
- pH= 7.9 ajusté avec l'acide acétique.

Préparation du gel d'agarose

- Préparer la cuve d'électrophorèse sur une plaque munie de pieds à vis. Disposer le plateau, les cales et peignes dans la cuve d'électrophorèse. Ajuster le niveau de de plateau à l'aide d'un niveau de plateau à bulle.

- Peser l'agarose nécessaire dans un erlenmeyer. Exemples : pour un minigel à 1%, peser 0,25g d'agarose. Pour un midigel à 4% peser 3,2g d'agarose.

- à l'aide d'une éprouvette ajouter le tampon TAE 5X (25 ml pour un minigel ; 80 ml pour un midigel et 250ml pour un maxigel)

- Peser l'erlenmeyer

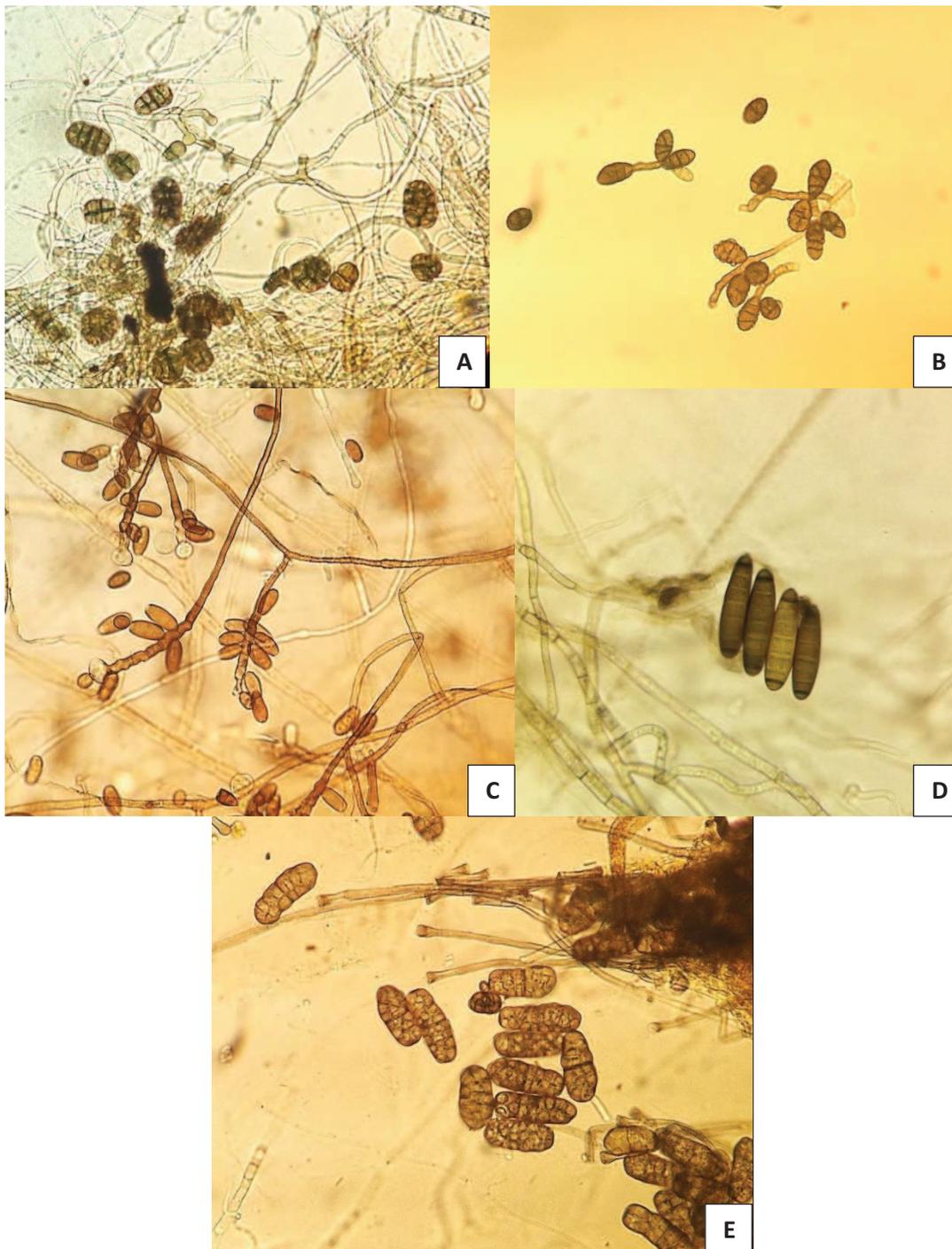
- faire fondre au microondes, bien homogénéiser pour obtenir un gel translucide.

- Peser à nouveau l'erlenmeyer, ajuster si nécessaire au poids initial avec de l'eau distillée en cas d'évaporation.

- laisser refroidir le gel à 50°C environ, puis couler le gel sur le plateau de la cuve d'électrophorèse. Laisser refroidir pendant 30min environ jusqu'à solidification.

- enlever le peigne et les cales, déposer dans la cuve d'électrophorèse et la remplir avec le tampon TAE 1X de façon à recouvrir le gel (2mm environ).

ANNEXE 6

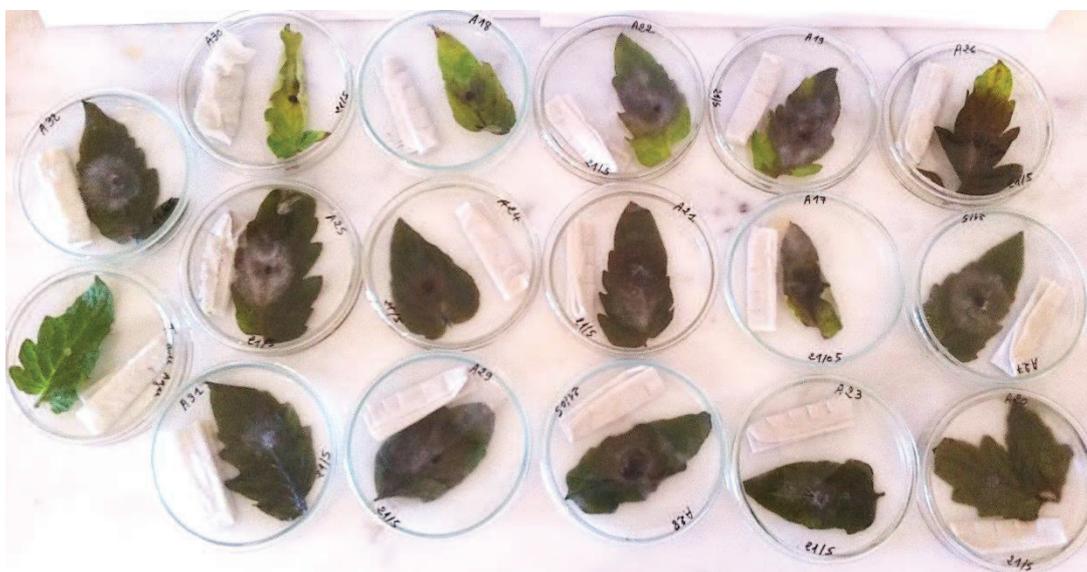


Morphologie des spores (Gr×400) : A. *Stemphylium* sp. (Souche 230) ; B. *Ulocladium* sp. (Souche 122) identifiée comme *A. consortialis* ; C. *Bipolaris* sp. (Souche 291) ; D. (souche non conservée) et E. *Stemphylium solani* (souche 268).

Clicours.COM



Développement de l'alternariose sur folioles de tomate détachées sans blessures. T : témoins inoculées avec du milieu PSA stérile et de l'eau distillée stérile; Feuilles inoculées avec des fragments mycéliens (A) ; feuilles inoculés avec les suspensions de conidies (B).



Folioles de tomates détachées blessées, inoculées par fragments mycéliens après huit jours d'incubation à 25°C.











